UNIVERSITÉ PARIS VII

N° d'enregistrement au C. N. R. S.
A. O. 7653

THÈSE
de
DOCTORAT d'ETAT ès SCIENCES

Spécialité : BIOCHIMIE

présentée

par

FLEURETTE LÉVY

SUJET DE LA THÈSE

ÉTUDE D'INHIBITEURS SOLUBLES SPÉCIFIQUES DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE DANS LES CELLULES DIFFÉRENCIÉES.

soutenue le 1973 *devant la Commission d'Examen*

MM. F. CHAPEVILLE — Président
JM. DUBERT
J. KRUH — Examinateurs
G. SCHAPIRA

UNIVERSITÉ PARIS VII

N° d'enregistrement au C. N. R. S.
A. O. 7653

THÈSE
de
DOCTORAT d'ETAT ès SCIENCES

Spécialité : BIOCHIMIE

présentée

par

FLEURETTE LÉVY

SUJET DE LA THÈSE

UNIV. PARIS VII

ÉTUDE D'INHIBITEURS SOLUBLES SPÉCIFIQUES DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE DANS LES CELLULES DIFFÉRENCIÉES.

soutenue le *devant la Commission d'Examen*

MM. F. CHAPEVILLE — Président
JM. DUBERT
J. KRUH — Examinateurs
G. SCHAPIRA

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Ce travail a été dirigé par M. le Professeur Jacques KRUH, Qu'il trouve ici toute ma reconnaissance pour m'avoir orientée dans la voie si intéressante de la différenciation cellulaire. C'est grâce à ses encouragements et à sa bienveillance que ce travail a pu être mené à bien.

Commencé au Laboratoire de Recherches de Biochimie Médicale à l'Hôpital Necker-Enfants Malades, ce travail a été poursuivi au Centre Hospitalo-Universitaire COCHIN, à l' Institut de Pathologie Moléculaire que dirige M. le Professeur G. SCHAPIRA.

Je tiens à remercier M. le Professeur Georges SCHAPIRA de m'avoir accueilli dans son Laboratoire et de m'avoir prodigué, ainsi que son équipe, l'aide nécessaire.

Je voudrais citer tout particulièrement M. le Docteur Nasser MALEKNIA, actuellement Professeur à l'Université de TEHERAN, dont la compétence, les critiques, les encouragements et l'inaltérable bonne humeur, ont été inestimables.

J'adresse mes remerciements à M. le Professeur J.C. DREYFUS et à Madame le Docteur Fanny SCHAPIRA pour les conseils et les suggestions qu'ils m'ont souvent apportés.

Ce travail a été rendu possible par la collaboration de Madame Lydie TICHONICKY, de Mademoiselle Odette GODARD et de M. Yves MEMASSE-LASNIER, que je remercie vivement.

Je voudrais remercier aussi tous mes camarades qui par leur attitude sympathique ont permis la réalisation de cette thèse.

Une partie de ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de M. François CHAPEVILLE, à qui j'exprime mes respectueux remerciements pour toutes les suggestions et les critiques dont il m'a fait bénéficier depuis mon entrée au C.N.R.S., et qui a bien voulu présider le Jury de cette thèse.

...

Je remercie vivement Mademoiselle le Docteur Anne-Lise HAENNI du Laboratoire de M. F. CHAPEVILLE pour son aide précieuse et son attitude compréhensive pendant la réalisation de ce travail.

J'adresse à M. Jean-Marie DUBERT tous mes remerciements pour avoir accepter de juger ce travail.

Abréviations

ARN	=	*acide ribonucléique*
ADN	=	*acide désoxyribonucléique*
ARNm	=	*acide ribonucléique messager*
µg	=	*microgramme*
Tris	=	*Tris hydroxy méthyl amino méthane*
EDTA	=	*Ethylène diamine tétra acétate*
TCA	=	*acide trichloroacétique*
ATP	=	*adénosine triphosphate*
GTP	=	*guanosine triphosphate*
P.M.	=	*poids moléculaire*
RNase	=	*ribonucléase*
TYMV	=	*Turnip Yellow Mosaïc virus* *virus de la mosaïque jaune du navet.*

I N T R O D U C T I O N

La différenciation cellulaire se produit au moment où l'oeuf fertilisé se divise pour former les nombreuses cellules filles qui en dérivent. La spécialisation de la cellule apparaît dès les premières divisions cellulaires, après la fécondation, dans plusieurs espèces.

Le processus de différenciation aboutit toujours à la transformation de la cellule parentale en cellules filles de morphologie différente. Ces différences morphologiques résultent du fait que chaque type de cellule différenciée contient de nombreuses espèces moléculaires qui leur sont spécifiques et qui persistent au cours des divisions ultérieures.

L'étude de la différenciation au niveau moléculaire est donc un problème extrêmement complexe. Il s'agit de comprendre non seulement pourquoi deux cellules filles commencent à synthétiser des protéines différentes, mais aussi de savoir ce qui les détermine à produire continuellement le même groupe de protéines.

Ceci conduit à envisager le problème de la différenciation sous deux aspects, le premier étant la formation de cellules différenciées, à savoir les phénomènes qui agissent sur la cellule, à l'origine indifférenciée et qui font que deux cellules filles se trouvent avoir des structures différentes. Le deuxième aspect concerne les mécanismes d'action, reversibles ou non, qui perpétuent ces modifications à l'échelle moléculaire.

...

Nos connaissances concernant le premier aspect sont très limitées. Dans certains cas, les influences extérieures agissent de manière évidente ; par exemple, dans l'oeuf d'amphibien, la pesanteur fait descendre le vitellus vers la partie inférieure de l'oeuf, d'où il résulte que dès les premières divisions cellulaires, les cellules du pôle inférieur auront plus de vitellus que les autres. Des expériences sur un changement de répartition des réserves de l'oeuf conduit à une modification du développement embryogénique.

Brown et Litna (1964) ont montré qu'il existait une différence très nette dans le profil de synthèse des ARN aux différents stades d'embryogenèse chez Xénopus. Non seulement la différence se manifeste dans la quantité d'ARN synthétisé, au cours des différentes étapes, mais dans la variation du taux de synthèse et de dégradation dans la constante de sédimentation, et la composition en bases, ce qui laisse prévoir qu'aux différentes étapes de la différenciation, il existe une modulation des gènes mis en service. Mais on ne peut encore répondre à l'objectif ultime qui est de comprendre par quels mécanismes un oeuf fécondé, encore indifférencié peut donner naissance à des cellules musculaires, cardiaques, nerveuses et rénales, etc.

Le deuxième aspect sous lequel on peut envisager le problème de la différenciation pose le problème des mécanismes de régulation qui interviennent de manière spécifique dans les différents tissus des cellules eucaryotes.

Beaucoup de travaux publiés dans ce domaine ont été inspirés d'observations faites chez les procaryotes, étant

donné que les mécanismes fondamentaux du transfert de l'information génétique, transcription et traduction, sont essentiellement les mêmes dans les cellules animales et dans les bactéries. Cependant la complexité du phénomène de régulation chez les animaux supérieurs est en partie due à ce que dans les cellules il y a économie de l'expression par rapport au potentiel génétique. Le DNA des cellules eucaryotes est très long et l'information nécessaire à la synthèse de toutes les protéines ne correspond qu'à une très petite fraction de ce DNA.

Par ailleurs il a été établi que le DNA des cellules eucaryotes possédait de très nombreuses séquences répétitives : des fragments sont répétés de 100 (Anan'ba et al.1968) à un million de fois (Britten et Kohn,1967).

Ceci peut s'expliquer en partie par le fait qu'au cours de l'évolution, de très nombreux gènes ont subi une duplication. Il en est résulté qu'ils se sont dispersés sur le chromosome ; ainsi les chaînes α et β de l'hémoglobine semblent être contrôlées par des chromosomes différents (Raper et al. 1960) (Smith et al. 1958). Nous sommes loin de la notion d'opéron telle qu'elle a été définie dans le système bactérien impliquant que les gènes qui contrôlent des enzymes ayant des corrélations métaboliques, soient juxtaposés sur le chromosome.

Alors qu'il a été bien établi que la régulation chez les bactéries intervenait essentiellement au niveau de la transcription, il s'avère que chez les organismes supérieurs,

...

les mécanismes post transcriptionnels jouent un rôle certain dans la régulation pour le maintien de la cellule dans un état différencié stable et pour une multiplication normale.

Le phénomène que nous avons observé et qui est l'objet de ce travail pourrait faire partie de l'un des nombreux mécanismes susceptibles d'intervenir entre les étapes de la transcription et de la traduction.

Dès les premières expériences d'incorporation d'acides aminés dans les protéines par des systèmes acellulaires, Hoagland et Zamenick ont mis au point des milieux d'incubation formés de microsomes et d'enzyme pH 5 appelé "fraction pH 5" ; Cette dernière fraction soluble comprenant des aminoacyl tARN synthétases et les ARN de transfert (Hoagland 1960). Un tel système préparé à partir de réticulocytes est capable de réaliser la synthèse d'hémoglobine (Schweet et al. 1958). Les ARN de transfert sont peu spécifiques puisque les aminoacyl tARN de E.coli peuvent servir de précurseurs pour la synthèse de l'hémoglobine par des ribosomes de réticulocytes. Dans ces conditions, on pouvait penser que l'on pourrait réaliser une biosynthèse d'hémoglobine en incubant des ribosomes de réticulocytes qui sont porteurs des ARN messagers et de la fraction pH 5 préparée à partir de divers types cellulaires de même origine animale. Ceci n'a été observé ni par Kruh et al. (1962), ni par Lamfrom et al. (1965). L'absence de synthèse d'hémoglobine peut s'expliquer soit par la nécessité d'un facteur soluble n'existant que dans les réticulocytes et capable de transférer les aminoacyl tARN sur les ribosomes (Arlinghaus et al. 1964), soit par l'existence d'un inhibiteur

...

de la synthèse de l'hémoglobine dans les fractions solubles de diverses espèces cellulaires. Il s'est rapidement révélé que cette deuxième éventualité était exacte et qu'il existait un inhibiteur soluble de la synthèse d'hémoglobine dont nous allons donner les caractéristiques.

Des inhibiteurs cellulaires de la synthèse protéique ont été décrits par ailleurs par Palm et al. (1964) dans les fractions solubles de E.coli, par Hoagland et al. (1964), liés aux ribosomes dans les cellules de rat, par Khouvine et al. (1965) dans les noyaux de foie. D'autre part, Kruh et al. (1961) ont montré que la fraction pH 5 contient des molécules susceptibles de transférer l'information génétique. En réalisant des incubations croisées avec des fractions subcellulaires de réticulocytes de lapin et de cobaye, on constate dans tous les cas une synthèse des deux hémoglobines, lapin et cobaye. Les informations nécessaires à la synthèse d'hémoglobine sont donc apportées par un facteur existant à la fois dans les ribosomes et dans la fraction pH 5. Ces résultats nous permettent de constater que la fraction pH 5 de réticulocytes d'un animal contient donc des constituants nécessaires à la synthèse de la molécule d'hémoglobine de cet animal ou d'un animal voisin. Par contre, la fraction pH 5 d'un organe, autre que les réticulocytes, d'un animal ne synthétise pas d'hémoglobine avec les ribosomes de réticulocytes de l'animal en question (Kruh et al. 1961), mais au contraire, inhibe la synthèse d'hémoglobine dans le système complet de réticulocytes (Kruh, Lévy, 1967). La fraction pH 5 transporte non seulement l'information liée à l'espèce mais également

...

l'information liée à l'organe et à la nature des protéines spécifiques synthétisées par chaque variété de cellules.

Par ailleurs, l'ARN total de noyaux de foie de lapin active la synthèse d'hémoglobine dans un système acellulaire de réticulocyte de lapin (Kruh et al. 1964) ainsi que le font les ARN totaux extraits d'autres organes : intestin, rein, coeur, rate. Plus précisément, il s'est révélé que la fraction d'ARN de foie isolée par centrifugation en gradient de saccharose, sédimentant entre 4 S et 10 S, qui correspond à la fraction contenant des ARN messagers de l'hémoglobine dans les réticulocytes, est la plus active (Kruh et al. 1966). D'autre part, les ARN de foie de rat, de souris, de cobaye et de poulet n'ont aucune action sur la synthèse de l'hémoglobine de lapin ; il en est de même des ARN ribosomaux et de cytoplasme de foie de lapin. Le chloramphénicol qui empêche la fixation d'ARN messager sur les ribosomes des procaryotes (Rendi et al. 1962) (Weisberger et al. 1964) empêche la stimulation de la synthèse de l'hémoglobine par l'ARN 4 à 16 S de l'espèce homologue sans modifier la synthèse endogène.

De ces expériences, on peut penser que les noyaux d'organes non hématopoïetiques pourraient contenir des ARN messagers de l'hémoglobine, messagers qui ne seraient pas traduits dans ces organes. Comme on l'a vu précédemment, la fraction pH 5 des organes non hématopoïetiques inhibait la synthèse d'hémoglobine dans un système acellulaire de réticulocytes contenant des ribosomes et de la fraction pH 5 de réticulocytes (Kruh et Lévy, 1967).

...

A la lumière de ces expériences, on a pensé qu'il existait dans la fraction pH 5 de différents organes, des mécanismes de régulation qui empêcheraient la traduction de certains messagers de protéine présents dans l'organe donné, qui ne seraient pas spécifiques de cet organe.

Ceci nous a conduit à étudier la fraction pH 5 extraite de foie et celle extraite de réticulocytes et leurs effets respectifs sur les systèmes homologues et hétérologues. Après avoir montré la nature protéique de l'inhibiteur, celui-ci a été isolé, partiellement purifié, et les expériences ont été réalisées en vue d'étudier son mécanisme d'action.

...

MATERIEL et METHODES

A - PREPARATION DES SYSTEMES ACELLULAIRES

I) SYSTEME ACELLULAIRE DE RETICULOCYTES DE LAPIN

1. Préparation du système

Le système acellulaire est préparé à partir de réticulocytes de lapin ayant reçu 5 injections de chlorhydrate de phénylhydrazine à 2 % à raison de 8 mg par Kg de lapin, pendant 5 jours.

Les lapins sont saignés par ponction cardiaque le 7e jour. Le sang est prélevé sur héparine. Les globules rouges sont lavés 2 fois au sérum physiologique puis hémolysés selon Schweet et al. (1958) par 4 volumes de $MgCl_2$ 5 mM, et un volume de solution de saccharose 1,5 M - chlorure de potassium 0,15 M.

L'hémolysat est centrifugé 10 minutes à 30.000 g et les ribosomes sont séparés de la solution surnageante par centrifugation pendant 1 heure à 140.000 g. Le surnageant est amené à pH 5,1 avec de l'acide acétique N ; le précipité obtenu est dissout dans 2 ml de Tris-Hcl 0,1 M pH 7,8, et sera appelé "fraction pH 5" de réticulocytes.

2. Le milieu d'incubation : Le milieu est formé de 0,5 ml de suspension de ribosomes, comprenant 6 mg de protéines, dans le milieu K, formé de $MgCl_2$ 4.10^{-3}M, Kcl 95.10^{-3}M, 0,5 ml de fraction pH 5 comprenant en général 10 mg de protéines, 0,1 ml

...

de $MgCl_2$ 2.10^{-2}M, 2 µmoles ATP neutralisés, 25 µmoles de créatine phosphate neutralisée et 200 µg de phosphocréatine kinase, 0,25 µmoles GTP, 0,5 µcuries ^{14}C Leucine (activité spécifique 150 mCi/mMole). A cette suspension est ajoutée soit une solution des fractions à tester, soit un volume identique du tampon Tris Hcl 0,1 M pH 7.8. Le volume final est 1,5 ml. L'incubation dure 1 heure à 37°. Dans toutes les expériences décrites dans ce travail, l'hémoglobine synthétisée a été isolée selon la méthode décrite ci-dessous.

3. Préparation de l'hémoglobine :

Après l'incubation, 35 mg d'Hémoglobine entraîneur sont ajoutés dans les milieux d'incubation . On centrifuge une heure à 140.000 g pour éliminer les ribosomes. Le surnageant est concentré dans un tube à dialyse sous vide. L'hémoglobine est isolée ensuite par électrophorèse sur bloc d'amidon pendant 16 heures à 60 mA et éluée avec de l'eau (Rosa, 1961). Elle est précipitée par le TCA 10 % et lavée 2 fois à l'acétone et 2 fois à l'éther selon la méthode de Zamenick et al. (1951). La poudre est séchée à l'étuve, sa radioactivité est mesurée dans un compteur sans fenêtre. Les corrections d'épaisseur sont effectuées d'après les courbes établies à l'aide de poudre radioactive de poids variable.

Les résultats sont exprimés en coups minutes incorporés pour la totalité de l'hémoglobine.

La comparaison de l'incorporation de 4 acides aminés différents (Kruh et al. 1966) et l'analyse peptidique de l'hémoglobine synthétisée par le système acellulaire a permis de montrer que seuls les peptides de cette protéine étaient syn-

...

thétisés (Schapira et al. 1966).

II) SYSTEME ACELLULAIRE DE FOIE DE LAPIN

1. Préparation du système

Le système acellulaire de foie est préparé selon la technique de Campbell et al. (1960). Des foies obtenus à partir de jeunes lapins sont broyés dans un homogénéiseur de Potter dans 3 volumes de milieu K-Mg contenant 10 mM de $MgCl_2$ 95 mM KCl 0,02 M Tris-HCl pH 7,8 et 0,35 M de saccharose.

L'homogénat est centrifugé 10 minutes à 30.000 g. Le surnageant est centrifugé 60 minutes à 140.000 g. La fraction pH 5 est préparée à partir de surnageant comme il a été décrit pour les réticulocytes. Le précipité microsomal est repris avec du K-Mg.

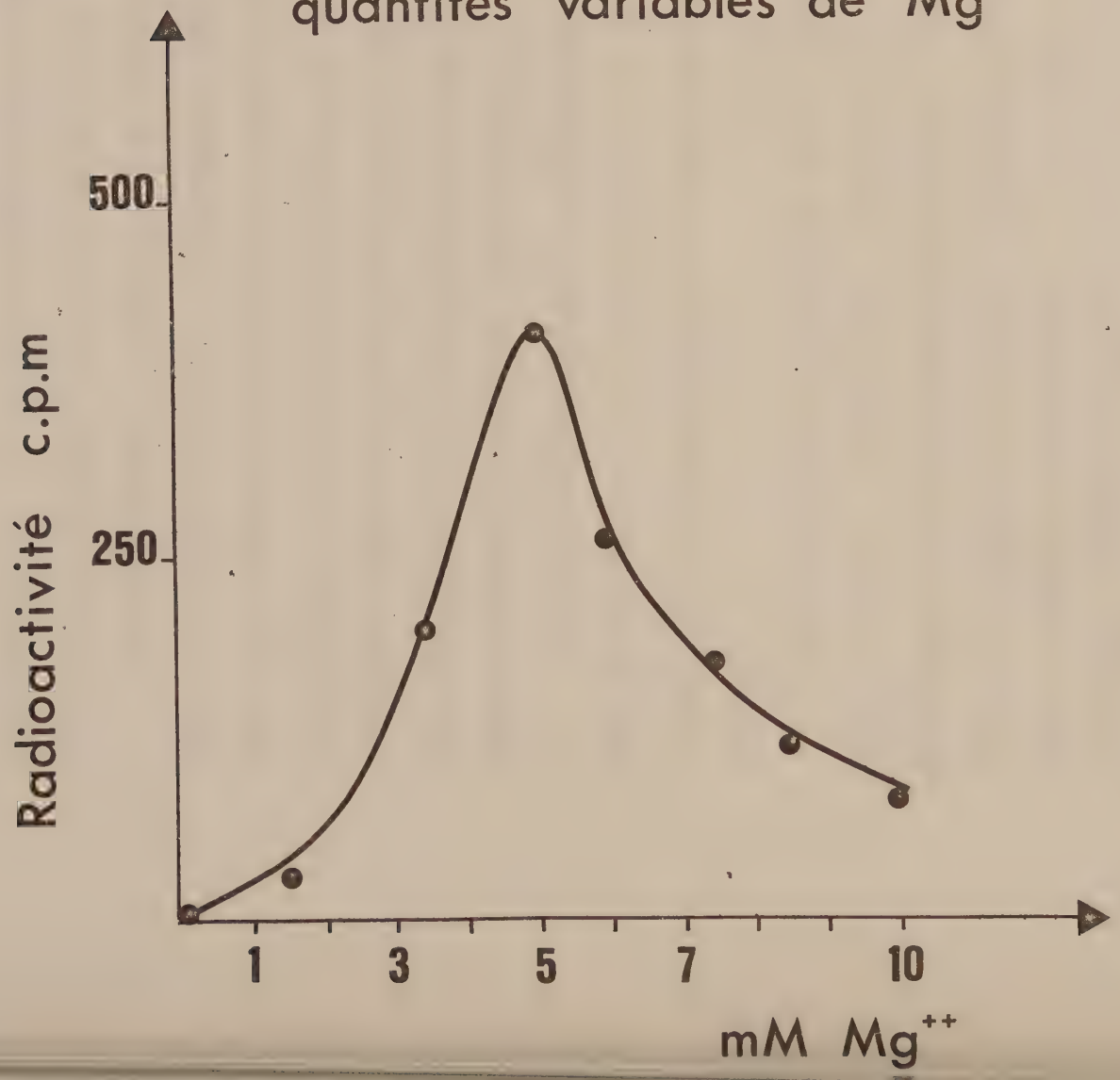
2. Le milieu d'incubation : Le milieu est composé de 0,5 ml de suspension microsomale (contenant 15 mg de protéine) 0,5 ml de fraction pH 5 (contenant 18 mg de protéine), 2 µmoles d'ATP neutralisés, 25 µmoles de créatine phosphate neutralisées, 300 µg de phosphocréatine kinase, 0,25 µmoles de GTP, 6 µmoles de glutathion réduit et 2 µCuries de ^{14}C Leucine (activités spécifiques 130 et 40 mCi/mM). La concentration finale en Mg^{++} est de 5 mM (fig. 1). La concentration finale en K^+ est de 75 mM. Le volume final est de 1,5 ml. Le système est incubé pour 1 heure à 37°. Toutes les expériences décrites ont comporté l'étape d'isolement de la sérum albumine (voir ci-dessous).

3. Préparation des protéines du foie et plus particuliè-

...

Fig.1

Synthese acellulaire de sérum albumine en fonction de quantités variables de Mg^{++}



rement la sérum albumine :

Après l'incubation, 10 mg de sérum albumine sont ajoutés comme entraîneur dans le milieu d'incubation, du deoxycholate de sodium est ajouté à une concentration finale de 1 % pour détacher les protéines des ribosomes. Après 30 minutes, à + 4° en agitant de temps en temps, les protéines sont précipitées par 1 volume de TCA à 10 %.

Le précipité est lavé avec du TCA 5 %, puis redissous dans 2 ml d'éthanol à 96 % contenant du TCA à 1 %. On recueille l'extrait soluble et on répète une fois l'opération éthanolique. Ces extraits sont dialysés une nuit contre de l'eau pour précipiter les globulines. Le surnageant contient essentiellement de la sérum albumine (ceci a été vérifié par électrophorèse sur acétate de cellulose).

La sérum albumine est précipitée par addition d'un volume de TCA à 10 %. La précipitation se fait à 0° pendant 1 heure et est complétée par un chauffage à 30° pendant 20 minutes.

Le précipité est lavé une fois à l'acétone et deux fois à l'éther. Il est pesé, dissous dans 0,5 ml d'acide formique et 2 ml de méthyl cellosolve. Après addition de 10 ml de liquide scintillant la radioactivité est mesurée dans un Nuclear Chicago Mark I. Le système acellulaire de foie étant énergie dépendant, il est plus actif lorsqu'on ajoute du pH 5 de foie plutôt que du surnageant.

III) PREPARATION DU SYSTEME ACELLULAIRE DE COLI

Selon la technique utilisée par Lucas-Lenard et Lipmann

...

(1967) et Revel et al. (1968), on utilise la souche d'E Coli MRE 600. Le milieu d'incubation contient dans un volume de 1,125 ml : des ribosomes (2,5 unités à 260 mμ) préalablement lavés au NH_4Cl 1 M et repris dans du Tris 0,03 M pH 7,5, 300 μg de surnageant S 150 préalablement dialysé contre 40 volumes de Tris 0,01 M (pH 7,5), 7 μmoles de β mercapto-éthanol, 40 μg de poly U, 6 μmoles de NH_4Cl, 2,5 μmoles d'ATP neutralisé, 3 μmoles de PEP, 4 μg de PEP kinase, 1 μmole de GTP, 2,5 μmoles de $MgCl_2$, 2,4 μmoles de ^{14}C phénylalanine (activité spécifique 235 mCi/mM). 150 μg de fraction d'inhibiteur sont ajoutés dans le milieu. L'incubation se déroule pendant quinze minutes à 37°. Les protéines sont précipitées par 2 ml de TCA 10 %, filtrées et lavées avec 10 ml de TCA 5 %. La radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation Nuclear Chicago en présence de 10 ml de solution d'Instagel.

...

B - PREPARATION DES INHIBITEURS A PARTIR DE FRACTIONS pH 5

I) PREPARATION DE LA FRACTION pH 5 DES DIFFERENTS ORGANES DE LAPIN

Le lapin gardé à jeun depuis 24 h est sacrifié par saignée. On prélève rapidement divers organes que l'on met dans la glace. On ajoute 4 volumes de milieu K et on soumet à l'homogénéiseur de Potter. La suspension est centrifugée 2 h à 140.000 g. A la fin de la centrifugation, on prélève le surnageant à la pipette en évitant de prendre la couche lipidique supérieure. Cette solution est amenée à pH 5,1 par de l'acide acétique N. Le précipité centrifugé est redissous dans le tampon Tris 0,1 M pH 7,8. Toutes ces opérations sont effectuées à + 4°. L'échantillon est concentré et dialysé contre un tampon Tris acétate 0.01 M pH 7,2 tampon d'équilibre des colonnes.

II) LA PREPARATION DE LA FRACTION pH 5 DES RETICULOCYTES

a été décrite dans la préparation des systèmes acellulaires (voir p. 8).

III) FRACTIONNEMENT DE pH 5 DE FOIE ET DE RETICULOCYTES

1. Fractionnement préalable sur carboxy méthyl cellulose II Whatman.

On utilise des colonnes de CM cellulose de 150 x 18 mm équilibrées avec du tampon Tris acétate 0.01 M pH 7,2. On dépose 500 mg environ de protéines. Les protéines basiques restent fixées sur la CM cellulose, les autres sont éluées

...

par le Tris acétate 0,01 M pH 7,2. L'éluat est directement passé sur la colonne de DEAE cellulose pour le fractionnement.

2. Fractionnement sur Diéthyl amino éthyl cellulose II Whatman

On utilise une colonne de DEAE cellulose de 150 x 10 mm équilibrée avec le tampon Tris acétate pH 7,2. On lave les protéines par 100 ml de Tris acétate 0,01 M pH 7,2 puis on utilise un gradient discontinu de concentration du même tampon à raison de 100 ml par étape d'élution. Le débit de la colonne assuré par une pompe est fixé à 15 ml/h. Le volume des fractions recueillies est de 2,5 ml. Les concentrations sont enregistrées sur un spectrophotomètre Gilford Model 2400 à 280 mμ . (voir Fig. 5). Les fractions correspondant aux pics d'absorption à 280 mμ sont rassemblées et concentrées dans des tubes à dialyse sous vide et seront testées pour leur activité inhibitrice. Chaque fraction contient approximativement 1 - 2 mg de protéine.

...

C - PREPARATION DES ARN

I) PREPARATION DE L'ARN DE NOYAUX DE FOIE

1. Préparation des noyaux

On utilise la technique de Hiatt modifiée (1962). Des lapins de 800 g sont laissés à jeun pendant 24 h puis sacrifiés par saignée à la carotide. Le foie est prélevé dans la glace. Toutes les opérations doivent être faites à + 4°. Le foie est homogénéisé dans l'appareil de Potter avec 3 volumes de solution d'homogénéisation : tampon Tris 0,05 M pH 7,2, saccharose 0,25 M, $CaCl_2$ $3,10^{-3}$ M. On filtre à travers 4 couches de gaze ; le filtrat est centrifugé 10 mn à 600 g. La couche inférieure contient les noyaux qui seront lavés deux fois avec deux volumes de la solution d'homogénéisation et centrifugés chaque fois 10 min. à 600 g.

2. Extraction de l'ARN

Les noyaux sont repris par deux volumes de milieu d'extraction comprenant 9 volumes de SDS à 1 % dans le tampon Tris 0,05 M pH 7,2 et un volume de la solution d'homogénéisation. Puis on ajoute du naphtalène disulfonate de sodium (NDS) à 5 % pour une concentration finale de 0,5 % et un volume d'une solution phénolique égal à celui des réactifs ajoutés, et contenant pour 86 ml de phénol, 1 % de SDS dans 20 ml de tampon Tris 0,05 M, pH 7,3, et 106 mg d'hydroxy quinoléine.

Après agitation pendant 30 min. à +4°, on centrifuge

...

10 min. à 5.000 t/min.. La couche aqueuse est prélevée, additionnée de 1/2 volume de phénol et l'agitation est répétée pendant quinze minutes. La couche aqueuse est additionnée de $NaCl_2$ M pour une concentration finale de 0,1 M ; on ajoute 2 volumes d'éthanol froid, on laisse 90 min. à -20° et on centrifuge 10 min. à 5.000 t/min. Le précipité est dissous dans du tampon Tris 0,01 M pH 7,3, $MgCl_2$ 10^{-3} M. On traite rapidement l'ADN qui reste sous forme de gel avec de la DNase à raison de 5 µg/ml de solution. On ajoute du SDS pour une concentration finale de 1 %, du NDS pour une concentration finale de 0,5 % et 1 volume de phénol. On agite 15 min. à +4° et on centrifuge. La couche aqueuse qui contient l'ARN est recueillie et additionnée de 2 volumes d'éthanol froid. On laisse précipiter l'ARN 16 h à -20°C.

3. Purification de l'ARN

La suspension est centrifugée 10 min. à 5.000 t/min. Le précipité d'ARN est dissous dans un peu d'eau à laquelle on ajoute de l'acétate de potassium 10 M pour une concentration finale de 2 M, de l'éthanol goutte à goutte pour une concentration finale de 20 à 30 % et une solution de $MgCl_2$ pour une concentration finale 10^{-3}M. Après 1 h à -20°, on centrifuge et l'ensemble de ces opérations est recommencé 2 fois.

Le précipité est ensuite dissous dans de l'eau et précipité par 3 volumes d'éthanol froid. Après 90 min. à -20°, on lave l'ARN à l'éthanol 95 % puis à l'alcool absolu où il est conservé à -20°.

...

L'ARN radioactif de foie est obtenu en injectant, 22 h avant le sacrifice des animaux, 45 µCi de 5^{-3} d'acide orotique (activité spécifique : 16 Ci/mMole) pour 100 g en poids de l'animal.

II) PREPARATION DE L'ARN DE RETICULOCYTES

Des lapins reçoivent comme décrit précédemment cinq injections de chlorhydrate de phénylhydrazine. Le sang est prélevé sur héparine par ponction cardiaque. Les globules rouges sont lavés 2 fois au sérum physiologique. L'extraction et la purification de l'ARN se font comme pour l'ARN de noyaux de foie.

III) PREPARATION DE L'ARN SELON LA METHODE DE KIRBY (1956)

L'ARN est préparé à partir de réticulocytes sans hémolyse préalable par addition de 4 volumes de phénol distillé (à 90 % contenant 1 % de EDTA) à une suspension de réticulocytes dans 3 volumes de sérum physiologique. On agite 1 h à température ordinaire. On centrifuge 1/2 h. On recueille la phase aqueuse. On ajoute au culot une quantité d'eau égale à celle prélevée. On agite et on centrifuge. On siphonne la couche supérieure qu'on joint à la première et ajoute aux 2 extraits un même volume de phénol. On agite, on centrifuge. On siphonne la couche aqueuse. On ajoute goutte à goutte de l'acétate de potassium à 20 % pH 6 pour avoir une concentration finale en potassium de 10 %. On ajoute 2 volumes d'alcool éthylique froid et on laisse précipiter une nuit à -20°.

...

IV) PREPARATION D'ARN A PARTIR DE FRACTIONS pH 5

La fraction de réticulocytes ou de foie est traitée par le phénol EDTA selon la technique de Kirby (1956). L'ARN est précipité par l'éthanol et repris par du tampon Tris 10^{-2}M pH 7,3 contenant du $MgCl_2$ 10^{-3}M . Si l'on veut détacher les acides aminés de l'ARN de transfert, on reprend l'ARN par du tampon Tris 10^{-2} M pH 9 $MgCl_2$ 10^{-3}M. Le pH est ajusté à 9 par NaOH IN. Après 30 min., on précipite l'ARN de la manière suivante : on ajoute 1/10e de volume d'acétate de potassium à 20 % pH 6 et on ajuste le pH à 5.5 avec l'acide acétique normal et on ajoute 2 fois le volume total d'éthanol absolu. Après 30 min. à -20°, on centrifuge et on lave le précipité par l'éthanol absolu. L'ARN desséché est dissous dans du tampon Tris 10^{-2}M (pH 7,3 M).$MgCl_2$ 10^{-3}M.

...

D - TECHNIQUES ANALYTIQUES

I) ELECTROPHORESES

1. Gel de polyacrylamide

Le critère de pureté des protéines est apprécié par analyse sur gel de polyacrylamide (5 % de cyanogum). Les électrophorèses sont réalisées avec 50 µg de protéine selon la technique de Labrie (1969) à 5 mA pendant 45 min., dans un tampon Tris 0,04 M pH 7,8 contenant de l'acétate de sodium 0,02 M et de l'EDTA 2mM. La protéine est colorée à l'amidoschwartz.

2. Estimation des poids moléculaires par électrophorèse en acrylamide SDS

On opère avec 100 µg de protéines selon la méthode de Shapiro et al. (1967) et Weber et al.(1969), en utilisant 10 % d'acrylamide et 0,1 % de dodécyl sulfate de sodium (SDS). L'électrophorèse est conduite pendant quinze heures à 3 mA par gel en tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,2. Les bacs des électrodes contiennent le même tampon mais à concentration de 0,05 M. Le SDS et le mercapto éthanol sont ajoutés à la protéine à une concentration finale de 1 % et dans les bacs à une concentration finale de 0,1 %.

3. Détermination du point isoélectrique par la méthode d'électrofocalisation

On calcule le point isoélectrique en utilisant 100 µg de protéine selon la technique de Awdeh et al. (1968) modi-

...

fiée par Wrigley (1968) qui consiste à employer une solution d'ampholine LKB 8 % dont le gradient de pH est compris entre 3 et 10. L'électrophorèse est conduite à 400 volts pendant 5 heures. Les protéines sont colorées au bleu de bromophénol.

II) DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES

Environ 1 mg de protéines est hydrolysé en ampoule sous vide par 1 ml de HCl 6 N contenant 0,09 % de phénol distillé (le phénol empêche l'oxydation de la tyrosine) pendant 22 h à 110°C.

Le fractionnement est fait sur analyseur d'acides aminés Beckman 120 C en utilisant une colonne longue pour les acides aminés neutres et acides et une colonne courte pour les acides aminés basiques.

III) GRADIENTS

1. Fractionnement de l'ARN sur gradient de saccharose

On établit un gradient de densité, d'après la technique de Britten et Roberts (1960) modifiée, à partir de 2 solutions de saccharose à 20 % et 5 % dans du tampon NaCl 0,1 M acide acétique 0,01 M pH 5. Le gradient se fait dans un tube de centrifugation SW 25 Spinco. L'ARN (1,5 mg) préalablement incubé avec 200 µg d'inhibiteur 30 min. à +4°C et ramené à pH 5,1 avec de l'acide acétique 0,1 N est déposé sur le gradient. A la fin de la centrifugation, qui dure 16 h à 36.000 g, des fractions de 10 gouttes sont recueillies après avoir percé le fond du tube. Des aliquots sont soumis à la spectropho-

...

tométrie à 260 mμ . Les fractions contenant les ARN 28 S, 18 S et 4 S et la fraction contenue entre 18 S et 4 S et qu'on appelle"ARN III" sont collectées et l'ARN est précipité par 2 volumes d'éthanol.

2. Gradient de polysomes de foie

L'analyse polysomale a été faite sur des ribosomes obtenus à l'ultracentrifugation en ajoutant à l'homogénat, débarrassé des grosses molécules, du désoxycholate de sodium pour une concentration finale de 1 % afin de dissoudre les fragments de membranes lipoprotéiques. Les ribosomes sont repris dans du Tris 0,05 M pH 7,4 contenant du KCl 5.10^{-2}M et du $MgCl_2$ 4.10^{-3}M. 1,5 mg de polysomes dosés en ARN sont incubés 15 min. en présence de 400 μg de protéine inhibitrice à 37°. Un gradient (-20 % est établi dansun tube rotor Spinco SW 25-1 au dessus d'une couche de 5 ml de sucrose 50 % et les polysomes incubés sont déposés au sommet du gradient. Après deux heures de centrifugation à 30.000 g, des fractions de 10 gouttes sont collectées. La concentration des polysomes dans chaque fraction est dosée à 260 mμ après une dilution dans 1,5 ml d'H_2O. Les corrections pour la présence de ferritine sont apportées selon la technique de Wilson et Hoegland (1965).

...

E - FORMATION DE COMPLEXES ENTRE ARN DE FOIE ET INHIBITEUR EXTRAIT DE RETICULOCYTES

I) FRACTIONS D'ARN DE FOIE ET INHIBITEUR EXTRAIT DE RETICULOCYTES

Chacune des fractions(29 S, 16 S, fraction III et 4 S) d'ARN marqué est recueillie après centrifugation en gradient de saccharose, dissoute dans 0,1 M de Tris 7,8pH. 100 µg sont incubés avec 100 µg d'inhibiteur en présence de $MgCl_2$ 4 mM à +4° pendant 30 min. dans un volume final de 1,5 ml. La réaction est arrêtée en ajustant le pH à 5 par addition d'acide acétique N précipitant ainsi les protéines et l'ARN qui leur est associé.

Le complexe est passé sur filtre Millipore HA 0.45 µm. Les filtres sont lavés avec 10 ml de tampon acétate I m pH 4,5, comptés dans un compteur à scintillation Vial et la radioactivité déterminée en présence de 10 ml d'Instagel Packard. Quand l'ARN est traité tout seul, aucune radioactivité est détectée sur les filtres.

II) ARN DE FOIE ET DIFFERENTES PROTEINES ISSUES DE LA FRACTION pH 5 DE RETICULOCYTES

A l'étape finale de la préparation de l'inhibiteur, différentes fractions sont éluées d'une colonne de DEAE cellulose (Lévy et al. 1971). 100 µg de l'ARN III de foie marqué au ^{14}C (ARN sédimentant entre 18 S et 4 S) sont incubés avec 100 µg de la fraction inhibitrice (fraction I éluée à 0,0 3 M Tris pH 7,2) et avec 100 µg de chacune des fractions qui précède et suit l'élution de la fraction inhibitrice, c'est-à-

...

dire respectivement : les fractions I et II éluées à 0.02 M Tris pH 7,2 et la fraction II éluée à 0,03 M Tris pH 7,2.

Les incubations et la mesure de la radioactivité sont faites comme indiquées ci-dessus.

...

F - TECHNIQUES DIVERSES

I) DOSAGE DES PROTEINES

Les protéines sont dosées par le réactif de Folin Ciocalteu selon Lowry et al. (1951) et par la méthode spectrophotométrique à 280 et 260 mμ de Kalckar (1947).

II) DOSAGE DE L'ARN

Pour une densité optique de 1.000 à 260 mμ, la concentration en ARN est de 34.3 μg/ml.

III) DOSAGE DE LA RIBONUCLEASE

On utilise une modification de la technique de Anfinsen et al. (1954). A l'échantillon contenant la ribonucléase éventuelle, on ajoute 2 mg de ARN de levure purifiée et on complète à 1.5 ml par un tampon Tris 5.10^{-2} M pH 7,5 $NaCl_2$ 10^{-2}M. On incube 25 min. à 37°. La réaction est arrêtée par addition de 0.5 ml d'acétate d'uranium à 0.75 % dans de l'acide perchlorique 3 M et 1.5 ml du tampon Tris. On centrifuge 20 min. à 20.000 g et on prélève 1 ml de surnageant que l'on dilue 5 fois. On mesure la densité optique à 260 mμ. Par ailleurs, on fait une courbe étalon avec des quantités variables de ribonucléase pancréatique et un témoin avec l'ARN et l'ensemble des réactifs. Cette méthode permet de mettre en évidence 0.05 μg de RNase. Par ailleurs, il était important de savoir quelle activité ribonucléasique était nécessaire pour perturber les gradients d'ARN, de ribosomes

...

et pour inhiber de manière significative la synthèse acellulaire de l'hémoglobine (Figures 2 et 2 bis).

IV) DETERMINATION DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE

On utilise la méthode de titration au pH state à l'aide du Titration Radiomètre. L'acidification provoquée par une protéolyse éventuelle est compensée par l'addition automatique de NaOH 0,05 N qui est enregistrée. On dissout 10 mg de globine de la chaîne β de l'hémoglobine dans 2 ml d'eau à 37° et on amène à pH 8,5 par de la soude 0,05 N. On ajoute 200 µg de l'échantillon à tester qui doit être au même pH. Pour détecter les protéolyses faibles, on ajoute après 30 min. d'incubation de l'HCl 0.01 N jusqu'à pH 6,4 qui précipite la globine. On centrifuge 30 min. à 20 000 g. Le surnageant est lyophilisé et soumis à l'analyse peptidique selon la méthode de Maleknia et al. (1966) sur résine cationique Technicon avec élution par un tampon 0.2 M acétique pH 3.10 et pyridine 2 M acétique pH 5 à 50°. L'intensité de la coloration obtenue par réaction à la ninhydrine est enregistrée automatiquement.

...

Fig. 2

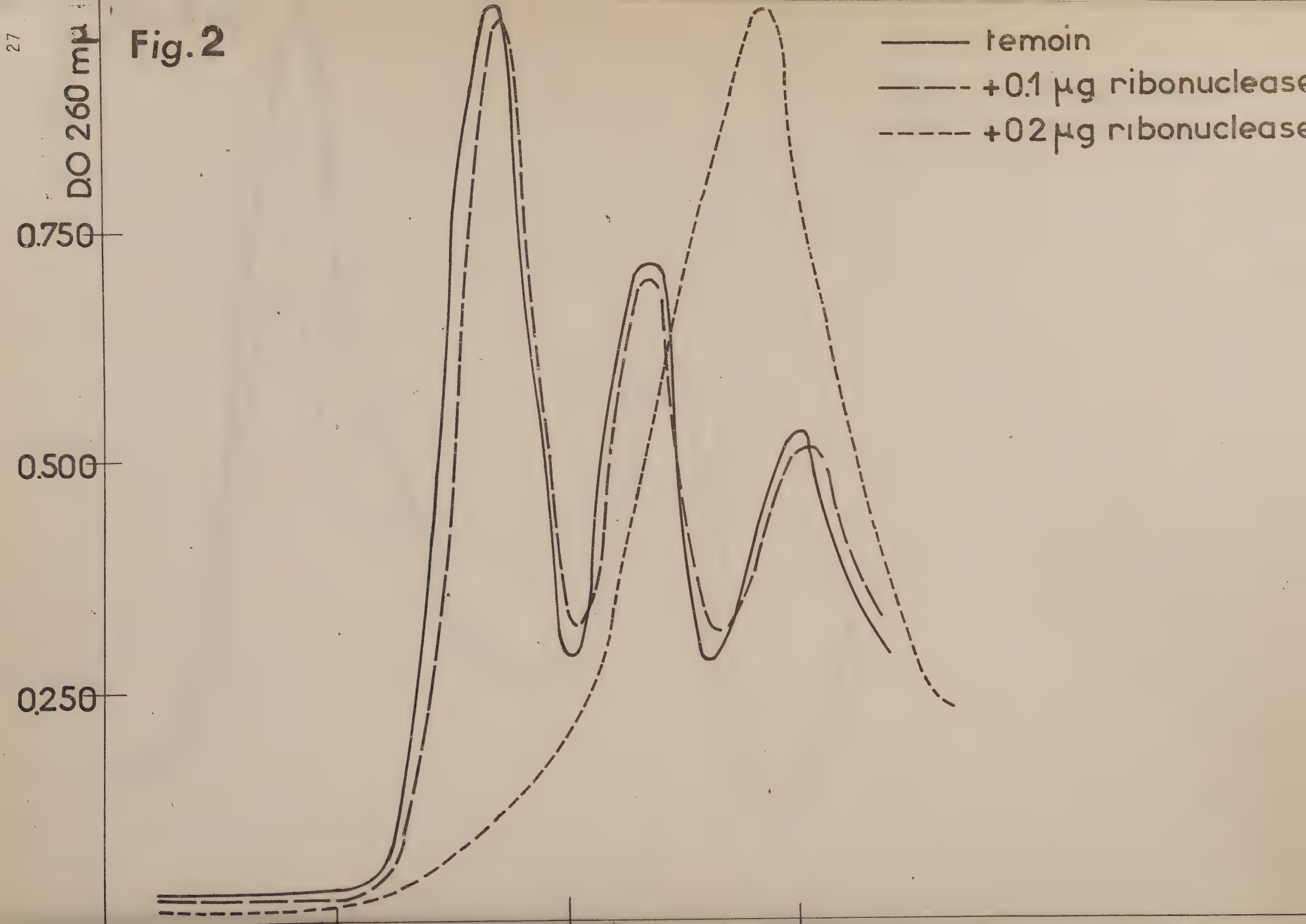
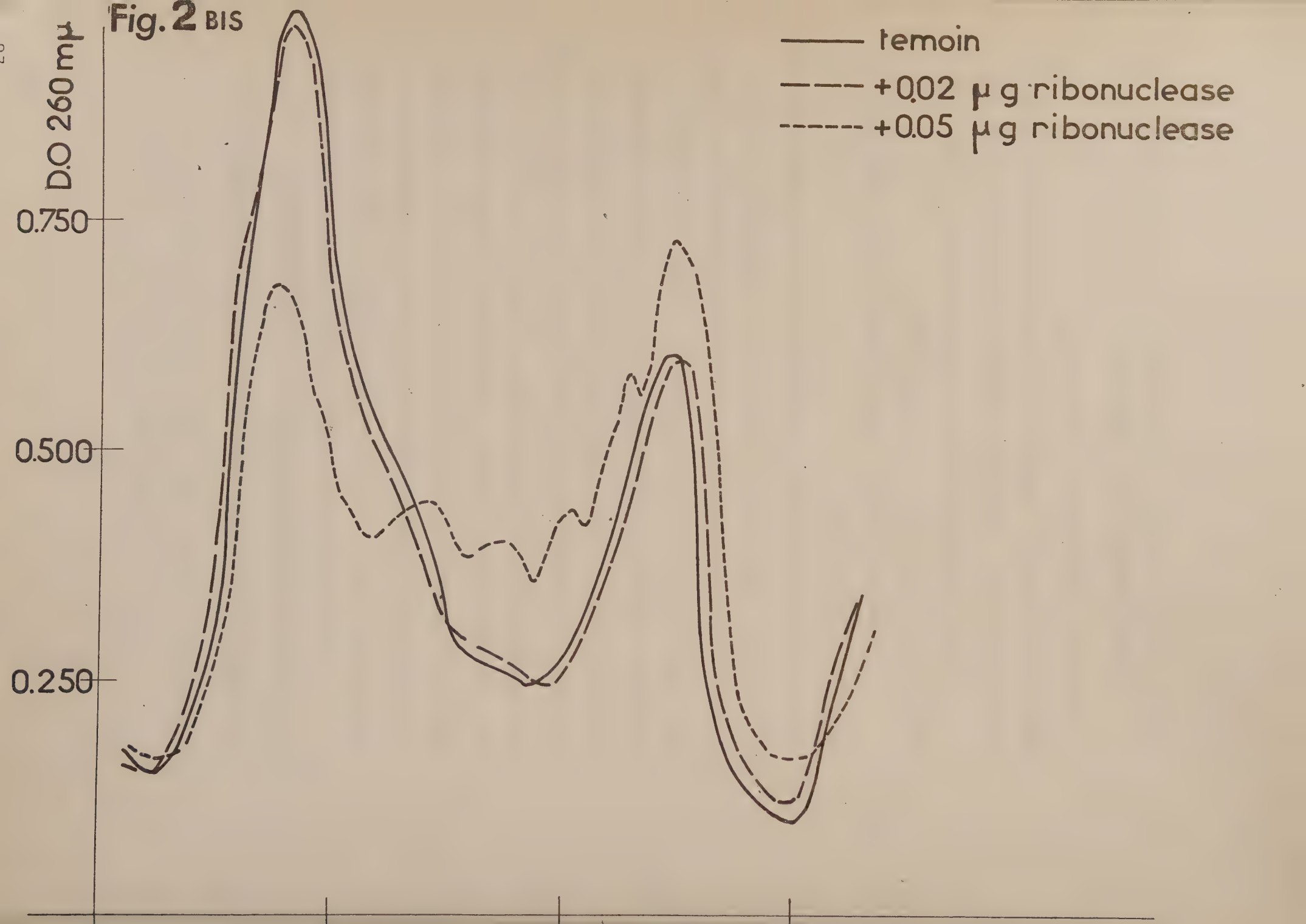

D.O 260 mμ
0.750
0.500
0.250
témoin
+0.1 μg ribonuclease
+0.2 μg ribonuclease

Fig. 2 BIS


D.O 260 mμ
0.750
0.500
0.250
témoin
+0.02 μg ribonuclease
+0.05 μg ribonuclease

RESULTATS

I) ACTION DE LA FRACTION pH 5 DE DIFFERENTS ORGANES

1. Sur un système acellulaire de réticulocytes

On ajoute des quantités variables de la fraction pH 5 de foie de lapin à un système acellulaire de réticulocytes. On observe une diminution de la synthèse de l'hémoglobine. Dans un système réticulocytaire, comprenant 6 mg de protéines ribosomales et 10 mg de fraction pH 5 de foie exprimés en protéines, cette quantité de fraction pH 5 abaisse d'environ 50 % la synthèse de l'hémoglobine, l'addition de 20 mg inhibe d'environ 75 % (Fig. 3). En fait si l'inhibition est toujours observée, l'intensité de celle-ci varie de manière non négligeable d'une expérience à l'autre. Cependant si l'on prend un système acellulaire de réticulocytes, on n'observe qu'une inhibition de 10 % de la synthèse si l'on met 25 mg de fraction pH 5 de réticulocytes et une inhibition de 15 % si l'on met 30 mg.

L'inhibition ne s'observe donc pas par addition d'un excès de fraction pH 5 de réticulocytes.

Nous avons préparé de la fraction pH 5 de rein, de coeur et de rate. L'addition de ces préparations à un système acellulaire de réticulocytes provoque une inhibition de la synthèse d'hémoglobine (Tableau I).

Localisation de l'inhibiteur

Comme il nous a semblé qu'il serait difficile d'obte-

...

Fig. 3

Synthese de l'Hb en fonction de quantités croissantes de fractions pH 5 de foie

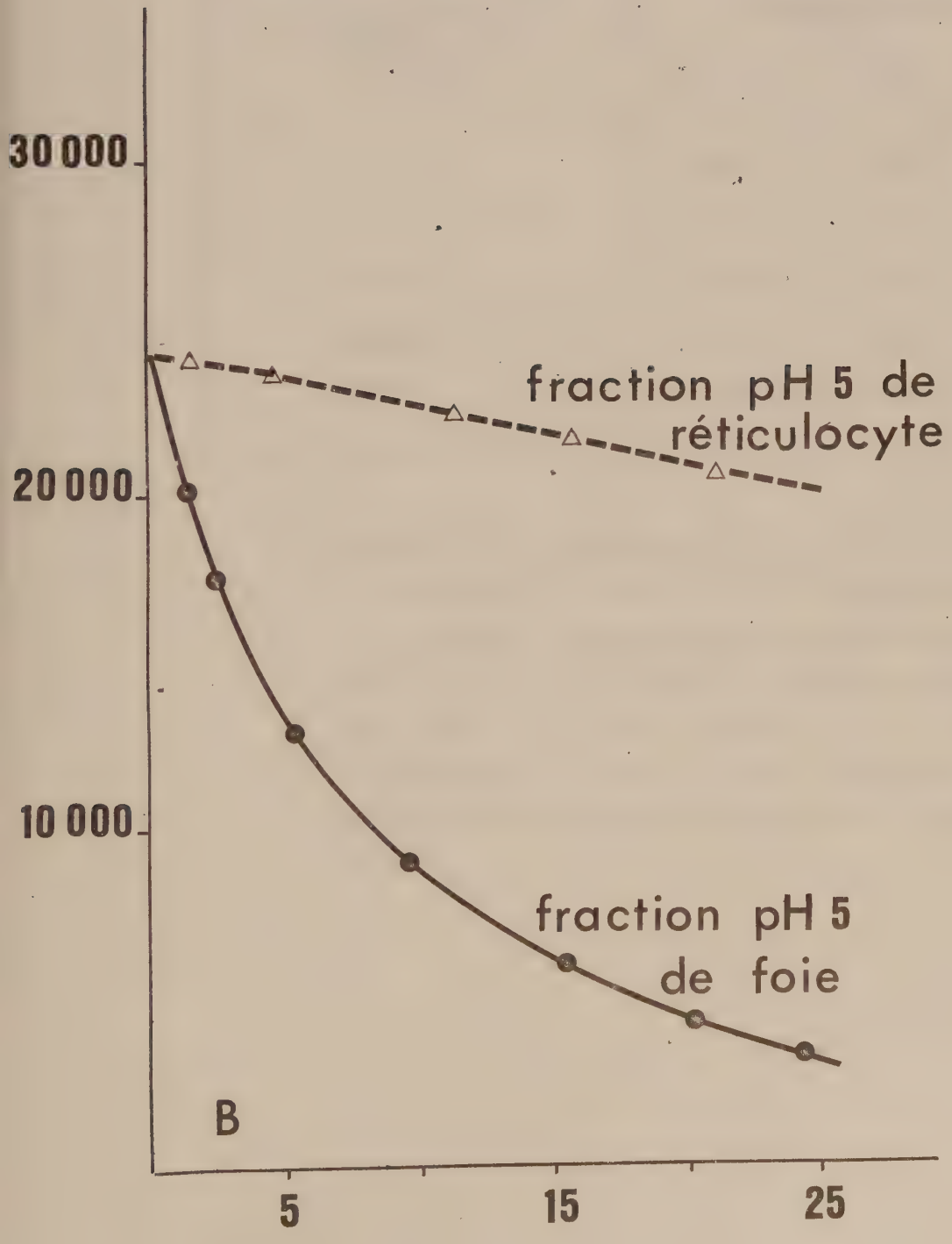


TABLEAU I

Origine de la fraction pH 5 ajoutée	HEMOGLOBINE (C.P.M.)			
	Ie Exp.	*2e Exp.*	*3e Exp.*	*4e Exp.*
0	17.300	10.300	9.600	6.350
FOIE .	3.280	2.500	1.800	1.785
REIN	3.140	1.785	1.000	1.100
COEUR	6.750	5.200	3.250	3.150
RATE	4.240	590	505	0

Action de la fraction pH 5 de diverses origines sur la synthèse acellulaire de l'hémoglobine.

Ces systèmes comprennent 10 mg de fraction pH 5 de réticulocytes exprimée en protéine et 20 mg de fraction pH 5 des autres organes. Les 4 expériences sont indépendantes, elles ont été faites avec des systèmes acellulaires et des fractions pH 5 préparées séparément.

nir une quantité suffisante de fraction pH 5 de noyaux de foie, nous avons comparé l'action inhibitrice de fractions pH 5 préparées à partir de foie total et à partir de cytoplasme de foie (Tableau II). Ces deux préparations ont la même activité inhibitrice. L'inhibiteur existe donc dans le cytoplasme. Nous avons soumis la fraction pH 5 à des centrifugations en gradient de saccharose 2 h à 18.500 t/min. On ne peut déceler aucun ribosome dans les fractions obtenues à partir des gradients. La centrifugation a donc bien permis d'éliminer toute particule. L'inhibiteur est donc localisé dans la fraction soluble. Par ailleurs on compare l'action sur le système de réticulocyte, de la fraction pH 5 de foie, et du"surnageant pH 5" de foie, fraction soluble qui résulte après élimination de la fraction pH 5. On constate (Tableau III) que seule la fraction pH 5 est inhibitrice. Donc l'inhibiteur est cytoplasmique et précipite à pH 5. On remarquera que l'inhibition est comparable, que la fraction soluble de réticulocytes soit la fraction pH 5 ou le surnageant pH 5.

Nature de l'inhibiteur

La dialyse de la fraction pH 5 de foie ne modifie pas le pouvoir inhibiteur qui est donc probablement lié à une macromolécule ; il est vraisemblable qu'il s'agisse d'ARN ou de protéine. Nous avons préparé l'ARN de la fraction pH 5 de réticulocytes et de foie. Une partie de ces ARN a été soumise à un traitement alcalin destiné à détacher les acides aminés qui y sont fixés. On constate qu'aucune des préparations n'est

...

TABLEAU II

Origine de la fraction pH 5 de foie	HEMOGLOBINE (C.P.M.)
0	15.400
Homogénat total	5.800
Cytoplasme	5.500

Comparaison de la fraction pH 5 de foie total et de cytoplasme de foie sur la synthèse acellulaire de l'hémoglobine.

TABLEAU III

Fraction soluble de réticulocytes	Fraction soluble de foie	Hémoglobine (C.P.M.)		
Fraction pH 5	0	6.330	11.400	7.700
Fraction pH 5	Fraction pH 5 (5 mg)			5.550
Fraction pH 5	" " (10 mg)		5.450	3.540
Fraction pH 5	" " (20 mg)	1.785		
" "	Surnageant pH 5	5.900	9.600	7.200
Surnageant pH 5	0		14.250	13.200
" "	Fraction pH 5 (5 mg)			8.200
" "	" " (10 mg)		5.850	5.800
" "	" " (20 mg)			3.100

Action de la fraction pH 5 ou du surnageant pH 5 sur des systèmes acellulaires de réticulocytes comprenant soit de la fraction pH 5, soit du surnageant pH 5 de réticulocytes.

inhibitrice (Tableau IV). Il est très vraisemblable que l'inhibiteur soit une protéine. Il fallait envisager le rôle possible de la présence de ribonucléases. La présence de cet enzyme est peu vraisemblable sinon la fraction pH 5 de foie ne pourrait être active dans un système acellulaire de foie.

Cependant, nous avons recherché cet enzyme avec une méthode permettant de mettre en évidence 0,05 µg ; aucune trace d'activité ribonucléasique n'a pu être décelée. L'inhibiteur est donc de nature protéique et n'a pas d'activité ribonucléasique.

2. Sur un système acellulaire de foie

L'addition de fraction pH 5 de réticulocytes à un système acellulaire de foie inhibe la synthèse de sérumalbumine. Le système acellulaire comprend 12 mg de fraction pH 5 de foie. L'addition de 12 mg supplémentaires de foie augmente la synthèse de 25 % et l'addition de 12 mg de fraction pH 5 de réticulocytes la réduit de 50 % comme on le voit sur la figure 4. Des fractions de rein, de coeur et de rate ont été testées sur le système acellulaire de foie. L'on constate que l'addition de ces préparations, à l'exception de la fraction coeur, provoque une inhibition de la synthèse de sérumalbumine (Tableau V).

II) PREPARATION DES INHIBITEURS

1. Inhibiteur extrait de foie

La fraction pH 5 de foie de lapin a été soumise à di-

...

Fig.4

Synthese de sérum albumine en fonction de quantités croissantes de fractions pH 5 d'Hb

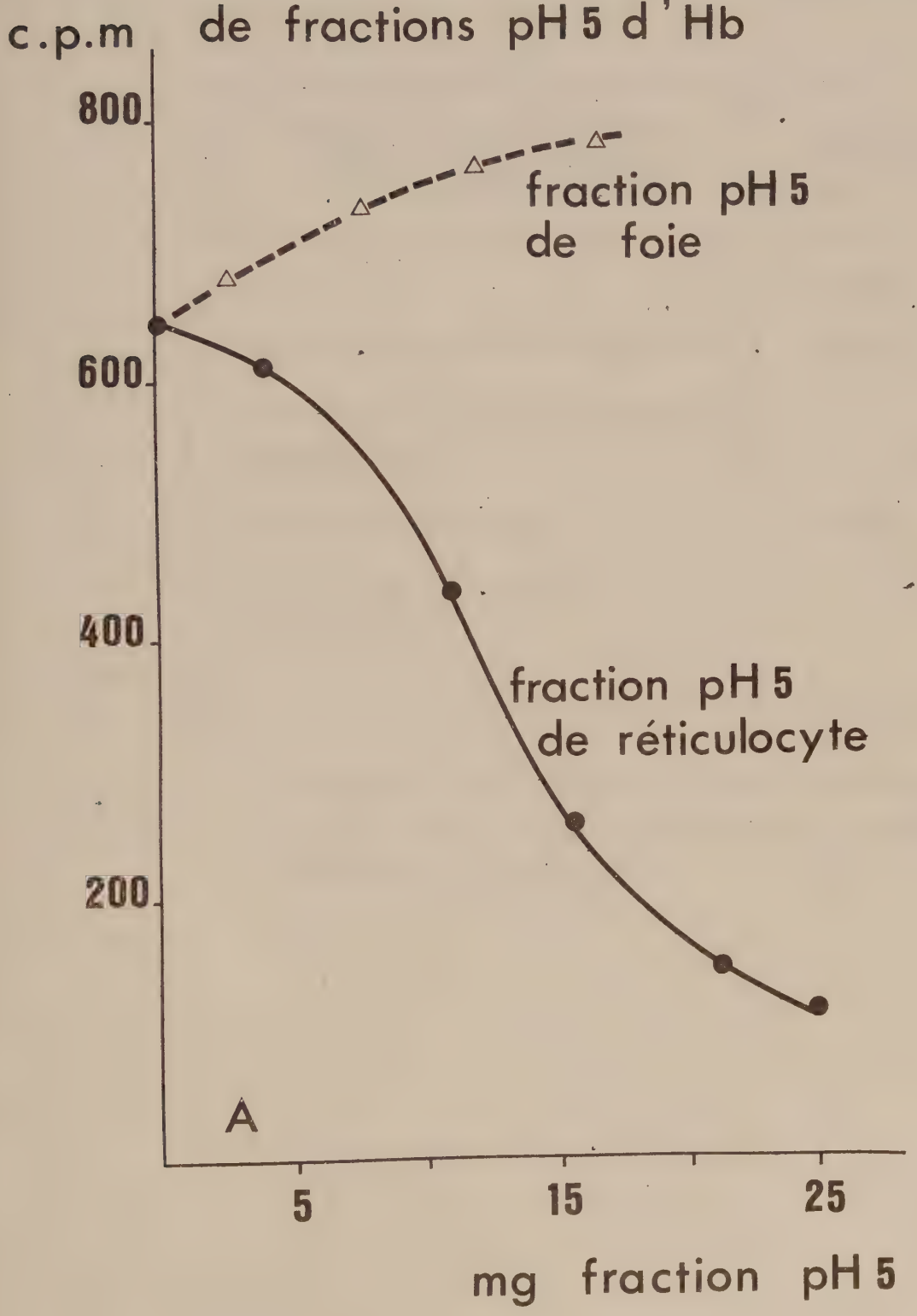


TABLEAU IV

Origine de l'ARN ajouté provenant de 10 mg de fraction pH 5 ajoutée	HEMOGLOBINE (C.P.M.) *Exp. I*	*Exp. II*
	13.300	30.200
Fraction pH 5 de réticulocytes	12.900	29.700
Fraction pH 5 de réticulocytes, ARN déacylé		30.600
Fraction pH 5 de foie	13.000	29.300
Fraction pH 5 de foie, ARN déacylé		29.700

Action de l'ARN préparé à partir de fractions pH 5 de foie ou de réticulocytes sur la synthèse acellulaire de l'hémoglobine.

TABLEAU V

Origine de la fraction pH 5 ajoutée	Sérumalbumine (C.P.M.)
0	7.470
RETICULOCYTES	1.480
REIN	1.110
COEUR	8.200
RATE	1.350

Action de la fraction pH 5 de diverses origines sur la synthèse acellulaire de foie.
Ces systèmes comprennent 20 mg de ribosomes, 10 mg de pH 5 de foie exprimé en protéines et 20 mg de pH 5 des autres organes.

vers fractionnements afin d'isoler et de purifier la protéine inhibitrice de la synthèse protéique. Le test a toujours été l'action sur la synthèse de l'hémoglobine par un système acellulaire de réticulocytes de lapin.

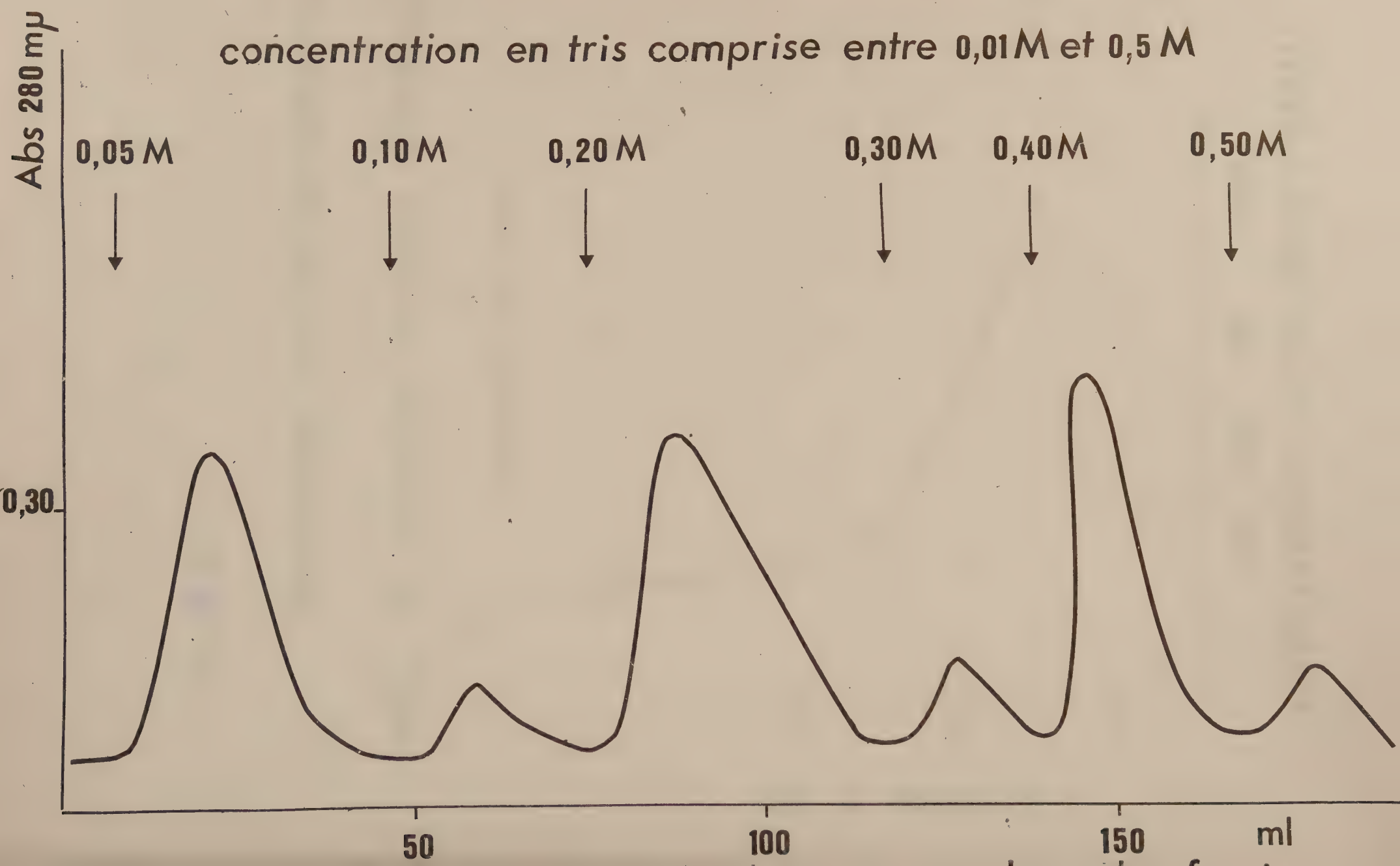
Dans une première série d'expériences, la fraction a été soumise directement à une chromatographie sur colonne de DEAE cellulose avec élution par un tampon tris acétate pH 7,2 en gradient discontinu de molarité. On constate que chaque nouvelle concentration de tampon fait apparaître un nouveau pic protéique (Figure 5). Les fractions protéiques correspondant à chacun de ces pics ont été concentrées par dialyse sous vide et ajoutées à un système acellulaire de réticulocytes. On constate que la fraction inhibitrice est éluée par le tampon 0,05 M (Tableau VI). L'inhibition augmente avec la quantité de protéines ajoutée au milieu d'incubation. (Fig.5bis) On a 76 % d'inhibition avec 1 mg de protéine contenant l'inhibiteur dans un système comprenant 16 mg de protéines (Tableau VII). On observe une inhibition identique si au lieu d'isoler l'hémoglobine, on mesure la radioactivité sur les protéines totales précipitées par le TCA.

On peut faire précéder la chromatographie sur DEAE cellulose par une chromatographie sur CM cellulose. La fraction pH 5 est éluée de cette colonne avec 100 ml de tampon Tris acétate 0,01 M pH 7,2 et passée directement sur colonne de DEAE cellulose dans les mêmes conditions que précédemment, et l'activité inhibitrice est éluée en présence du Tris acétate pH 7,2 0,05 M. Dans ces conditions, on observe une purification considérable de l'inhibiteur puisque 200 µg de

...

Fig. 5

Elution de la fraction pH 5 de foie par une concentration en tris comprise entre 0,01 M et 0,5 M



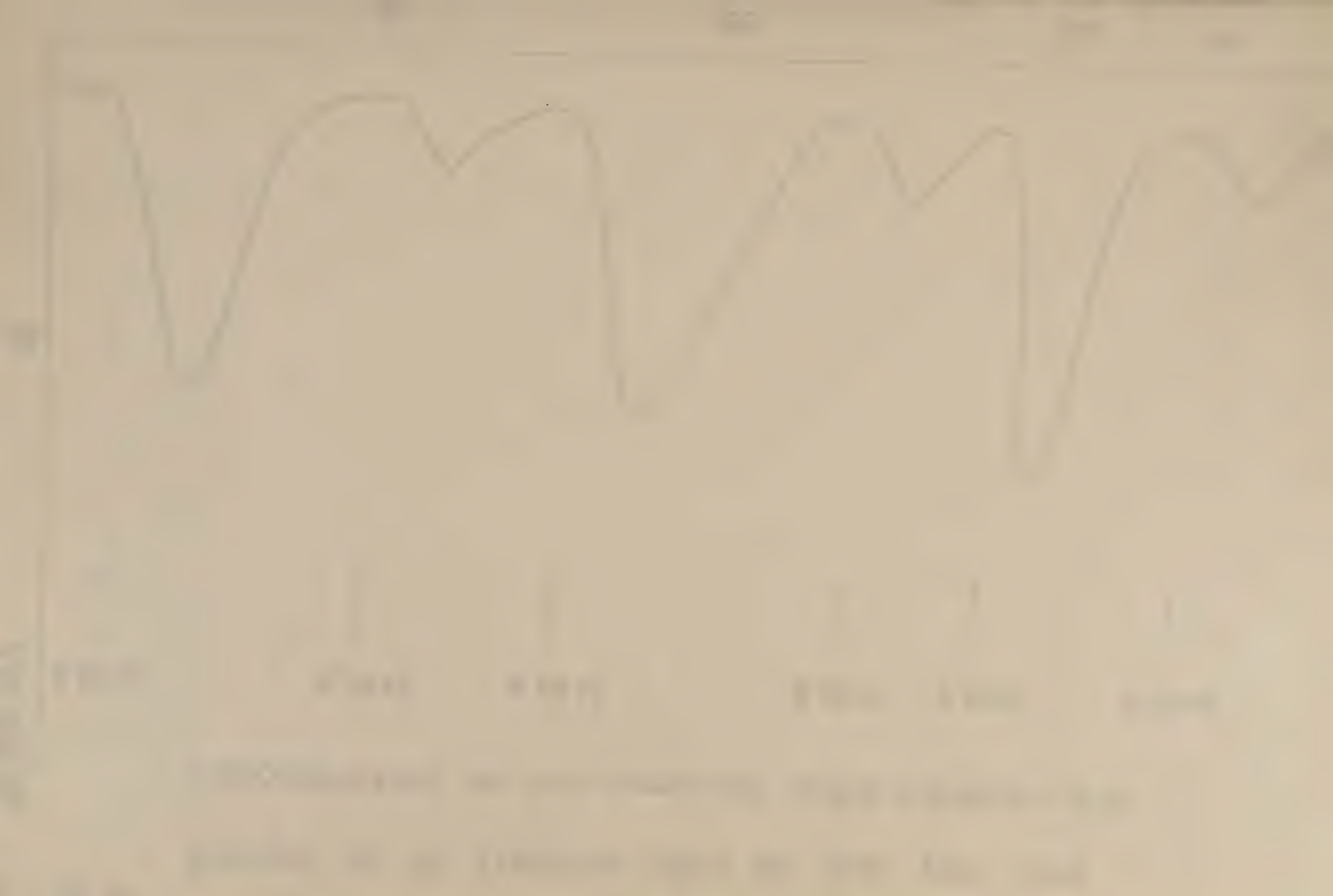


Fig. 5 BIS

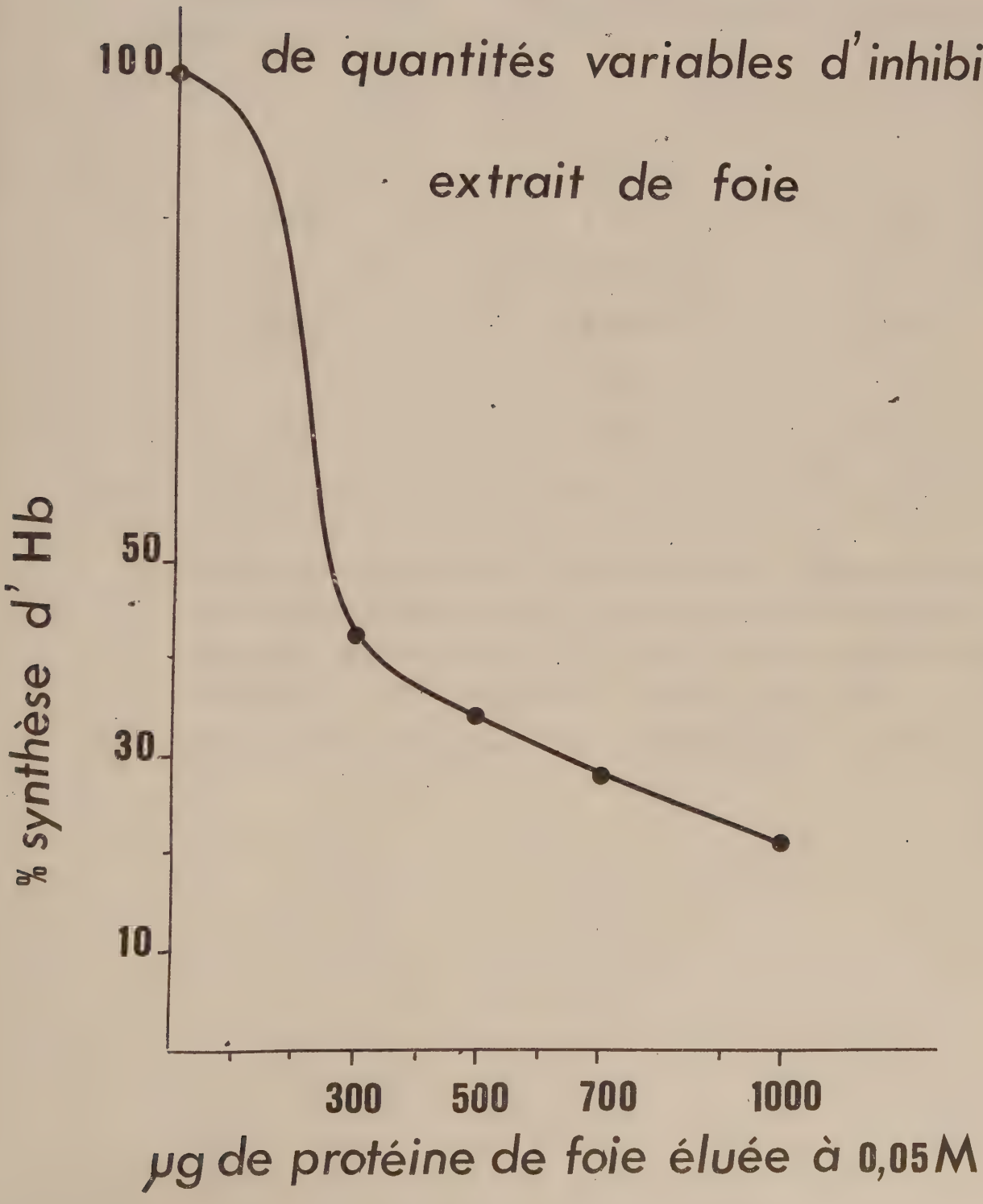

Biosynthese de l'Hb en présence
de quantités variables d'inhibiteur
extrait de foie
100
50
30
10
% synthèse d'Hb
300
500
700
1000
µg de protéine de foie éluée à 0,05M

TABLEAU VI

Fraction ajoutée (concentration de l'éluat)	Hémoglobine (C.P.M.)	Activité spécifique Hb / Activité spécif.Hb témoin
0	7.700	
0.05	1.800	0.2
0.1	10.500	1.3
0.2	6.200	0.8
0.4	9.800	1.2
0.5	7.800	1.0

Action sur la synthèse acellulaire de l'hémoglobine de différentes fractions de protéines cytoplasmiques de foie précipitant à pH 5.15 à partir de surnageant post-ribosomal de foie et obtenu sur DEAE cellulose.

On a ajouté 300 µg de chaque fraction par incubation.

TABLEAU VII

Quantité de Protéines ajoutées (à µg)	Hémoglobine (c.p.m.) Témoin	+ Inhibiteur	Inhibition %
0	33.400	0	0
300	33.400	14.200	58
500	33.400	11.800	65
700	33.400	9.700	70
1.000	33.400	8.200	76

Action sur la synthèse acellulaire de l'hémoglobine de quantités variables de fraction protéique éluée d'une colonne de DEAE cellulose par le tampon 0.05 M.

protéines contenant l'inhibiteur suffisent pour inhiber de 70 à 74 % la synthèse de l'hémoglobine (Tableau VIII). La fraction éluée de la colonne de DEAE cellulose par le tampon, 0,05 M a été concentrée et dialysée et soumise à un nouveau fractionnement sur colonne de DEAE cellulose par le tampon Tris acétate pH 7,2 avec un gradient discontinu de molarité compris entre 0,015 et 0,05 M (Figure 6).

La majorité de l'activité inhibitrice est éluée par le tampon Tris 0,03 M (Tableau IX). Comme on peut le constater sur la Figure 6, un double pic est élué à 0,03 M. Il a parfois été possible de le séparer (Figure 7) et de constater que le pic I contient plus d'activité inhibitrice que le pic II (Tableau X).

2. Inhibiteur extrait de réticulocytes

La fraction pH 5 de réticulocytes est soumise à une chromatographie sur CM cellulose et le volume exclu est passé directement sur une deuxième colonne contenant du DEAE cellulose (comme décrit dans la technique). La séparation a lieu sur cette deuxième colonne avec des concentrations en Tris variant de 0,03 M à 0,1 M (Figure 8). Les pics obtenus sont concentrés et ajoutés à un système acellulaire de foie (Tableau XI). L'éluat à 0,03 M présente l'activité inhibitrice la plus forte.

En opérant sur une nouvelle colonne et en effectuant une première élution à 0,02 M, nous avons constaté que 2 pics apparaissaient (Figure 9). Chaque pic a été concentré et ajouté à un système acellulaire de foie. Une forte inhibition

...

TABLEAU VIII

Expériences	HEMOGLOBINE Témoin + Inhibiteur (200 µg)		Inhibition %
1	11.200	3.500	70 %
2	31.700	8.450	73
3	53.500	13.700	74

Action sur la synthèse acellulaire de l'hémoglobine de la fraction obtenue en utilisant une double chromatographie CM et DEAE cellulose.

Fig.6 Elution de la fraction pH 5 de foie par une concentration en tris comprise entre 0.015 M et 0.05 M

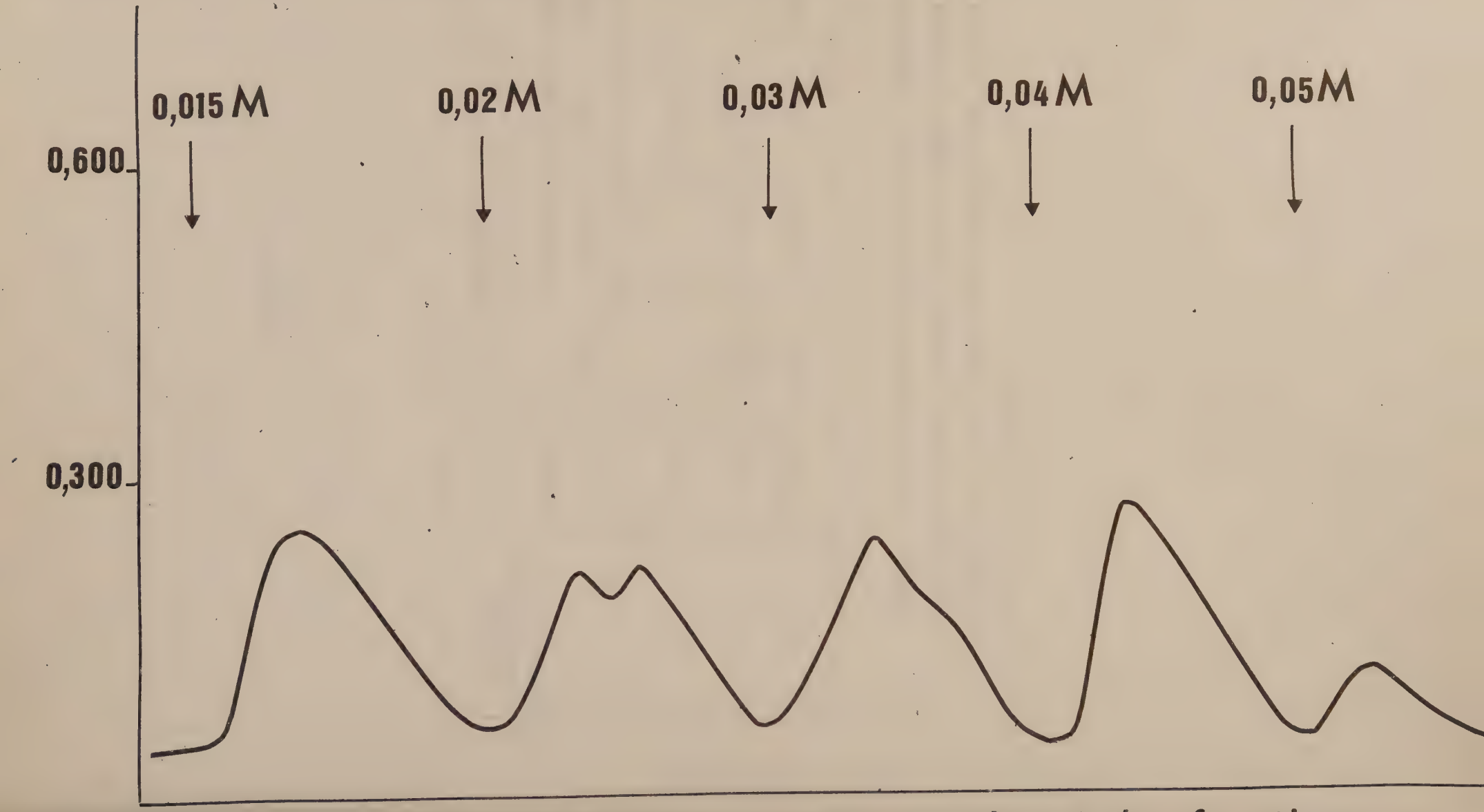
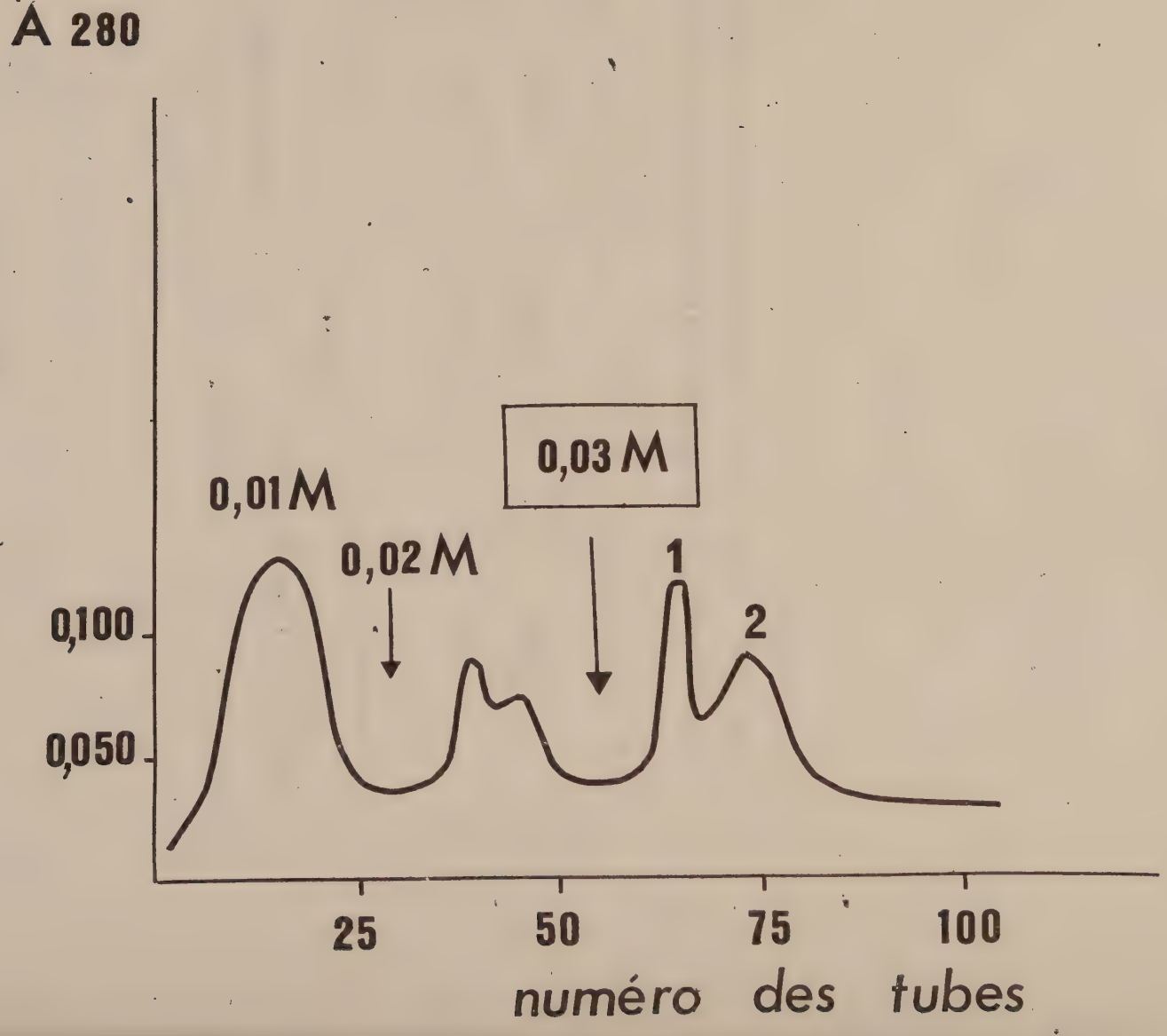


TABLEAU IX

Quantité d'inhibiteur ajouté (µg)	HEMOGLOBINE (C.P.M.)					
	Témoin	en présence d'éluats (molarité)				
		0.015	0.02	0.03	0.04	0.05
200	18.000			3.600		
300	9.900	5.600	3.990	3.780		
300	17.400	15.500	14.400	705	17.400	16.000

Action sur la synthèse acellulaire de l'hémoglobine des différents éluats obtenus sur une double colonne de CM et DEAE cellulose avec une concentration en tris variant de 0.01 M à 0.05 M.

Fig. 7



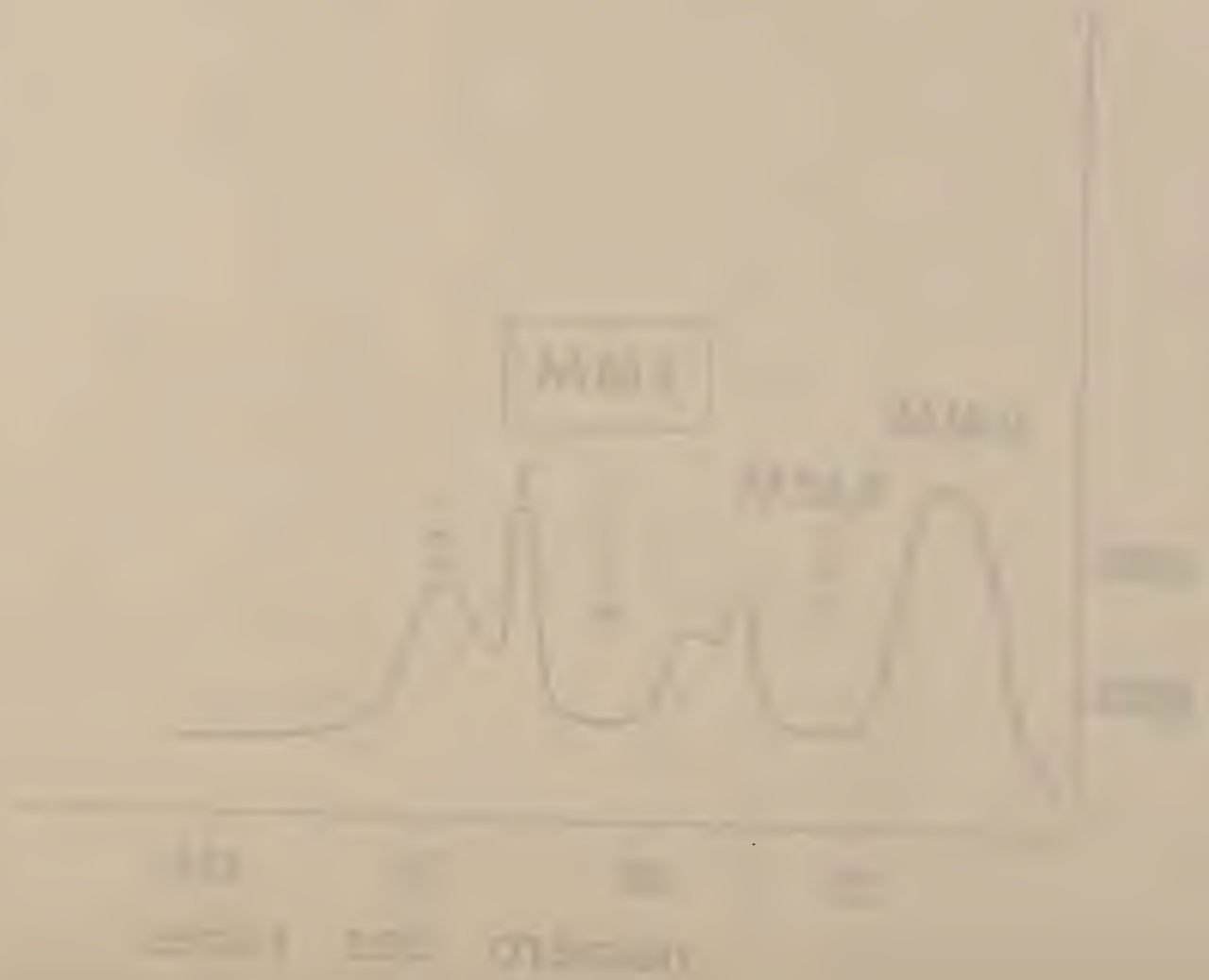
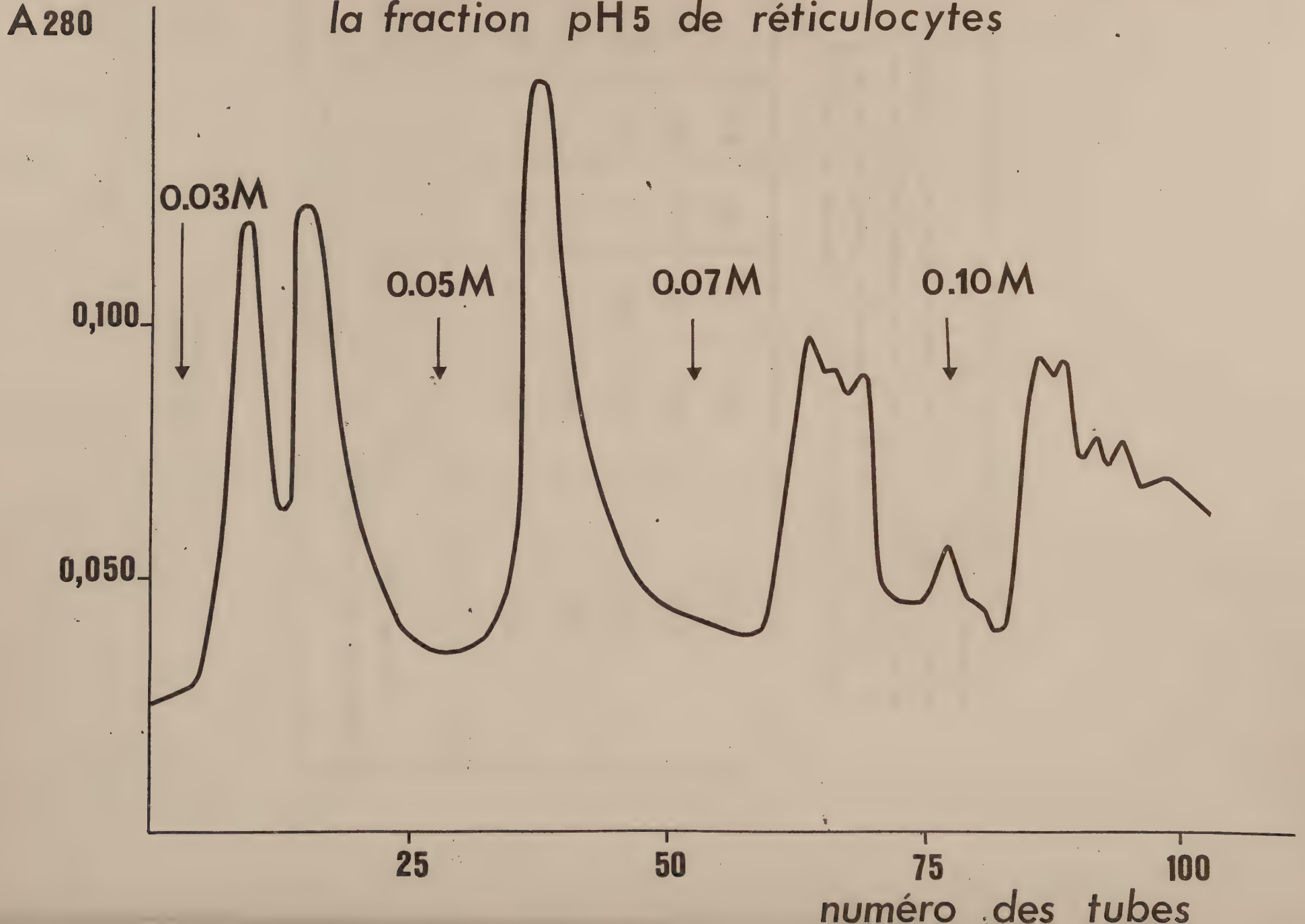


TABLEAU X

Quantité de protéines ajoutée (µg)	HEMOGLOBINE		
	Témoin .	+ Pic I .	+ Pic II
100	37.000	5.400	55.000
100	15.000	3.200	11.400

Action sur la synthèse acellulaire de réticulocytes des pics I et II de la fraction pH 5 de foie éluée à 0.03 M.

Fig.8 Fractionnement sur DEAE cellulose de la fraction pH5 de réticulocytes



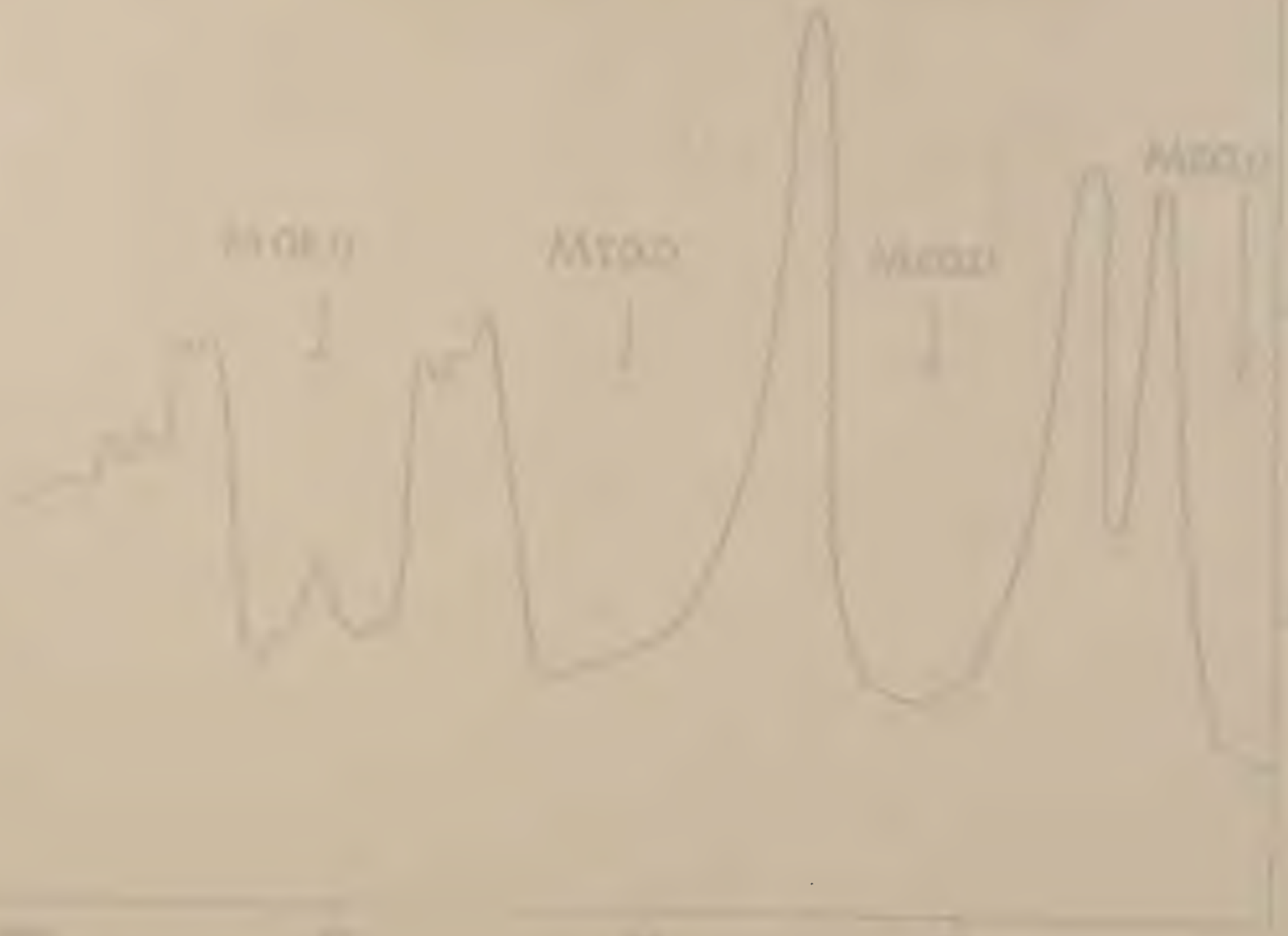


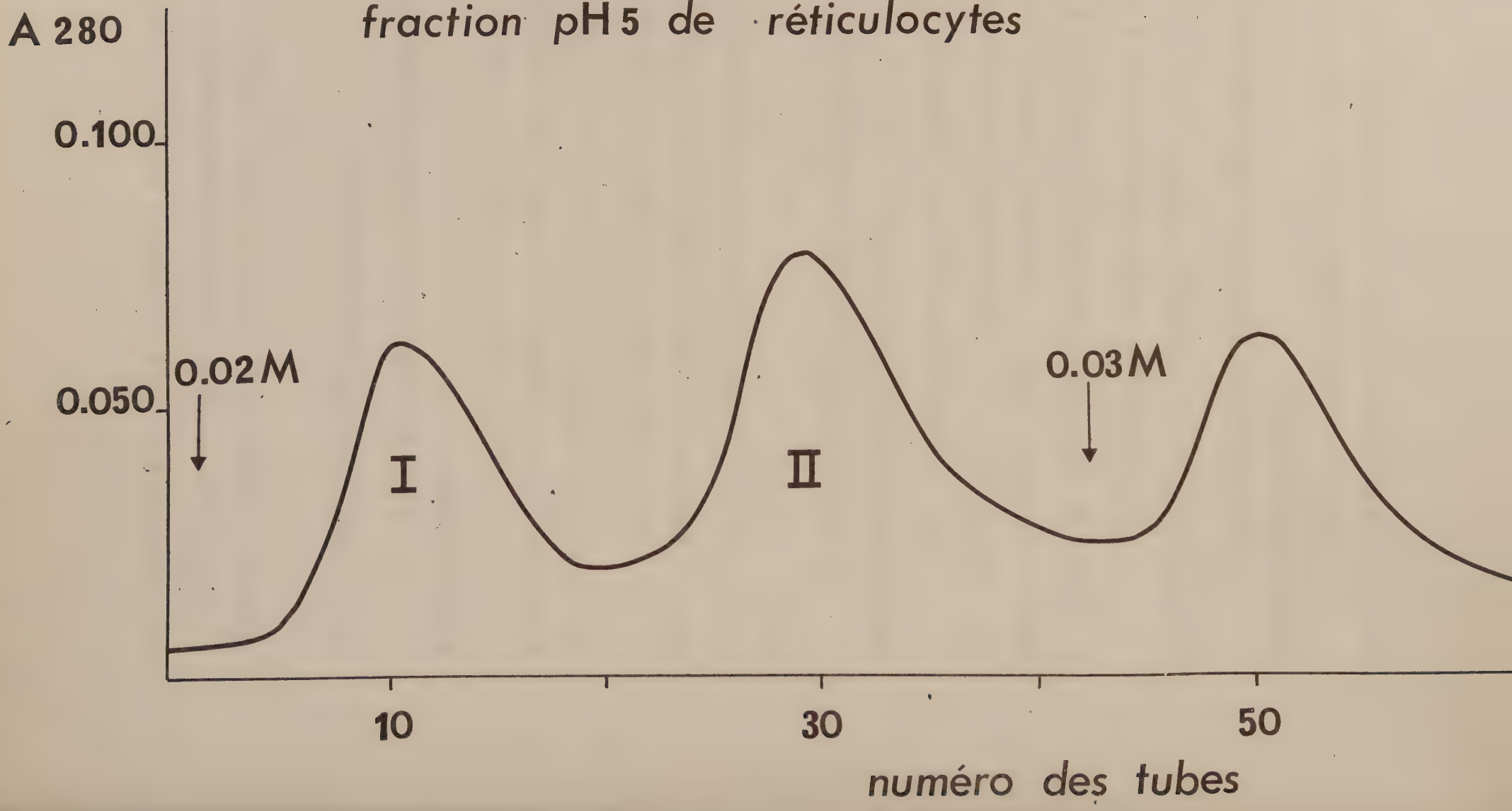
TABLEAU XI

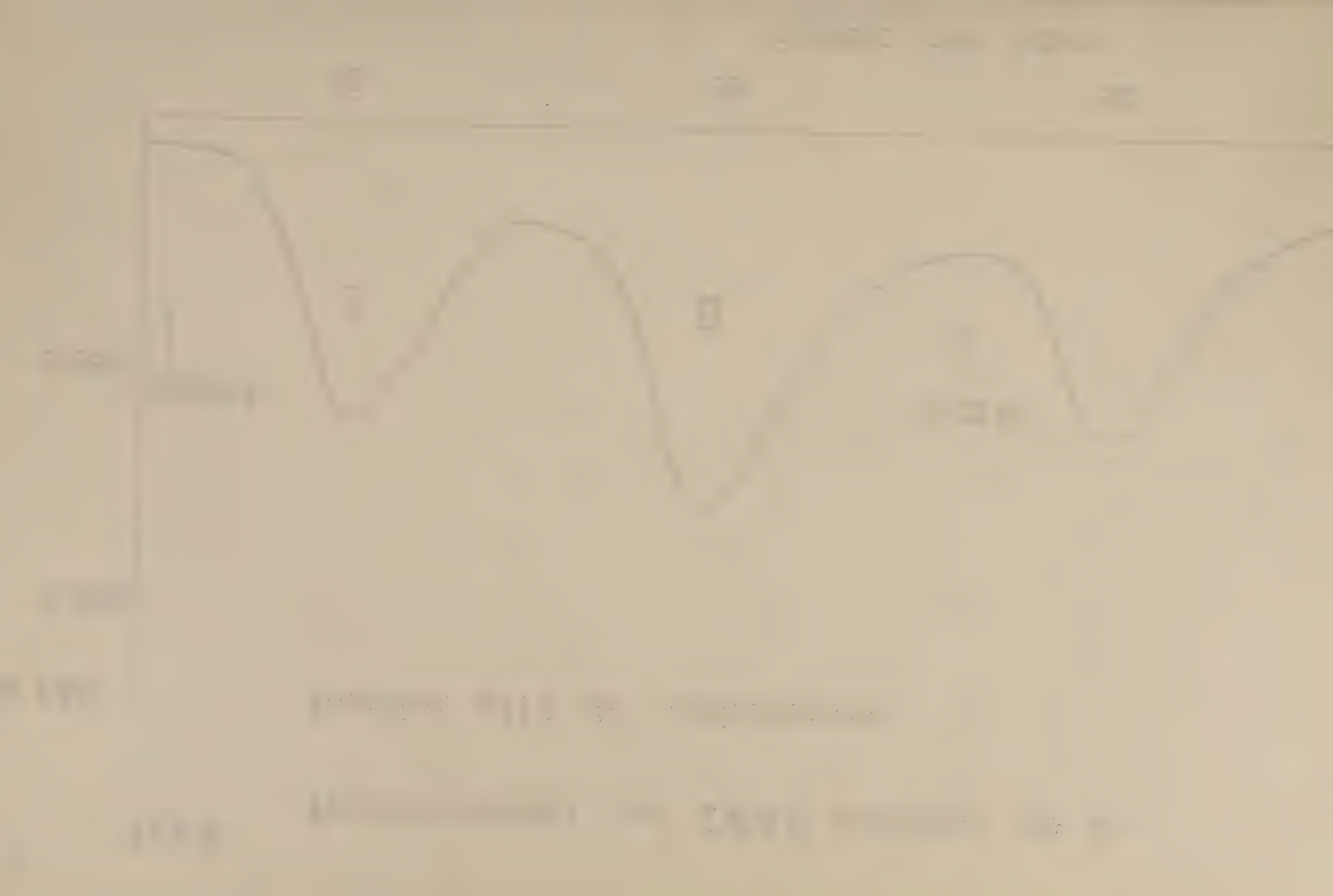
Quantité de protéine ajoutée (µg)	SERUMALBUMINE (C.P.M.) *Fractions ajoutées (molarité)*				
	Témoin	0.03	0.05	0.07	0.10
200	650	253	426		755
200	930	130	552		1.050
250	1.125	285	510	960	1.600
375	625	65	242	640	835
500	900	70	200	800	

Synthèse de sérumalbumine par un système acellulaire de foie en présence de différentes fractions de pH 5 de réticulocytes obtenues après chromatographie sur colonne de DEAE cellulose avec un gradient discontinu de concentration en tris (pH 7,2).
L'activité spécifique de la Leuc.^{14}C est de 40 mCi/mM.

Fig. 9

Fractionnement sur DEAE cellulose de la fraction pH 5 de réticulocytes





est observée avec le pic I élué à 0,02 M en Tris (Tableau XII). On observe que l'inhibition est proportionnelle aux concentrations de l'inhibiteur (pic I) ajoutées (Figure 10).

III) ETUDE ANALYTIQUE DES INHIBITEURS

1. Critère de pureté par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

a) L'électrophorèse du pic I de réticulocytes élué à 0,02 M en Tris acétate nous montre une bande majeure à pH 7,8 et une deuxième bande mineure très faible (Figure 11).

b) L'électrophorèse du pic I de foie élué à 0,03 M en Tris acétate nous montre trois bandes à pH 7,8 (Figure 12). Il faut signaler que le foie contient beaucoup plus de protéines.

2. Détermination du poids moléculaire des inhibiteurs par la méthode d'acrylamide-SDS.

a) L'inhibiteur et d'autres protéines de P.M. connus sont soumises à l'électrophorèse sur acrylamide-SDS dans les mêmes conditions. Pour l'inhibiteur extrait de réticulocytes, on trouve un P.M. approximatif de 70.000 (Figure 13).

b) L'inhibiteur extrait de foie nous a donné aussi un poids moléculaire proche de 70.000 (Figure 14).

3. Détermination du pHi des inhibiteurs par la méthode d'électrofocalisation

a) Un gradient linéaire de pH entre 3 et 10 a été établi en utilisant une solution d'ampholine LKB. Avec

...

TABLEAU XII

Quantité de protéine ajoutée (µg)	SERUMALBUMINE (C.P.M.) *Fraction ajoutée (molarité)*			
	Témoin	0.02 M I	0.02 M II	0.03 M
100	8.400	3.470	6.800	6.650
200	5.670	2.420	4.930	4.630

Synthèse de sérumalbumine par un système acellulaire de foie en présence de chacun des deux pics obtenus avec du tris 0.02 M et le pic obtenu avec du tris 0,03 M (pH 7.2).

L'activité spécifique de la Leuc. ^{14}C est de 130 mCi/mM.

Fig.10

Synthèse de sérum albumine en fonction de quantités croissantes du pic I de réticulocytes recueilli à 0,02M Tris Acétate pH 7,2

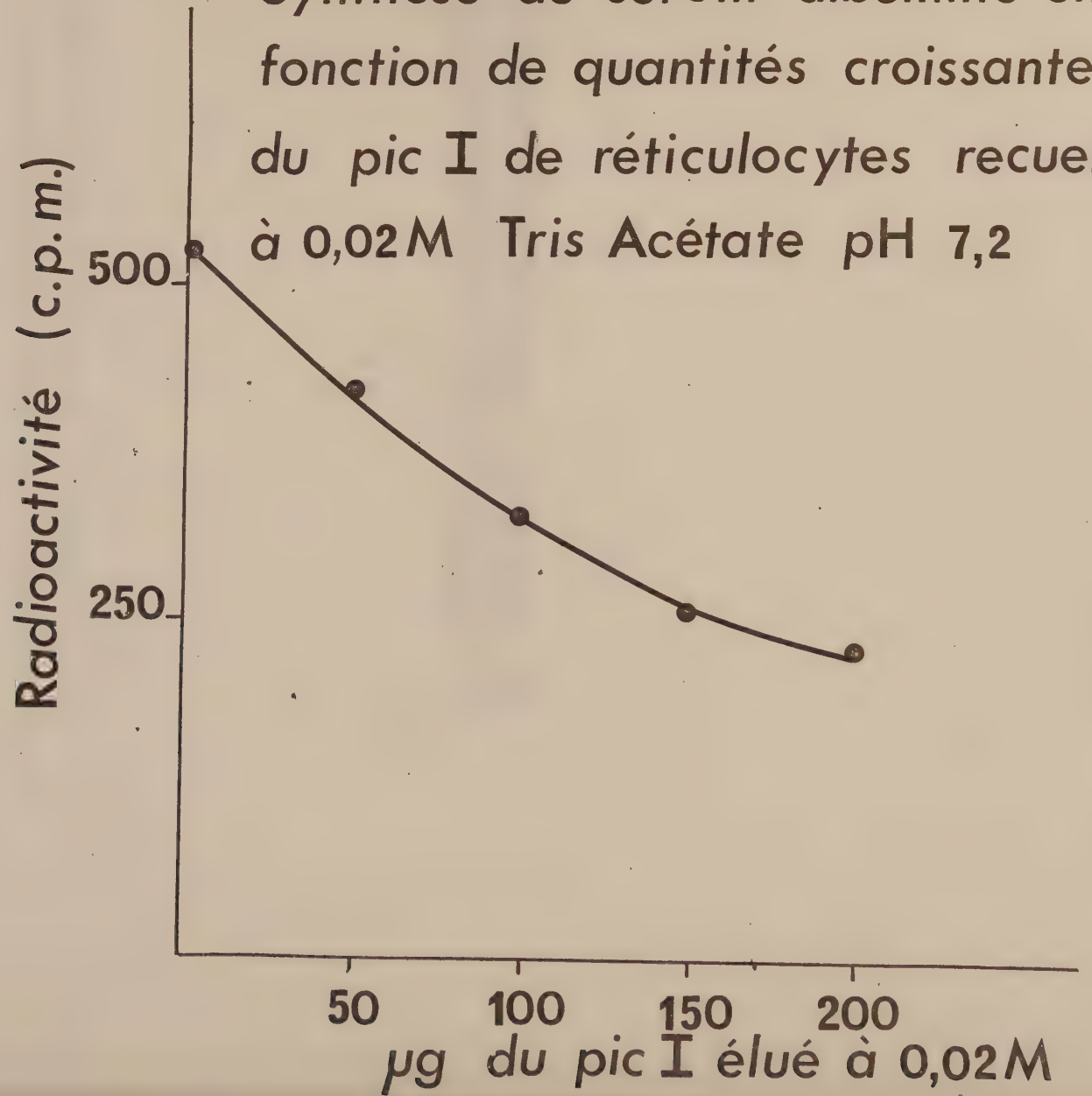


FIGURE 11

Electrophorèse sur gel d'acrylamide à 5 % de 50 µg du pic I de réticulocytes élué à 0.02 M (pH 7.2).

L'électrophorèse est conduite dans un tampon Tris 0.04 M pH 7.8, 0.02 M acétate de sodium et 2 mM EDTA pendant 45 min. à 5 mA.

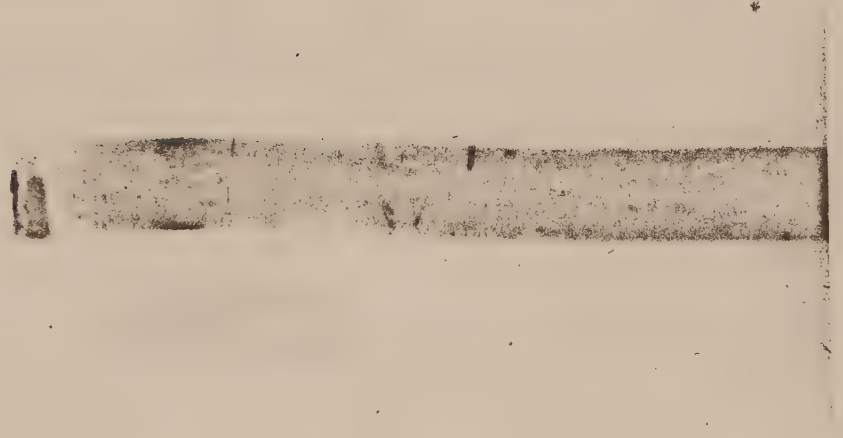


FIGURE 12

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide à 5 % de 50 µg du pic I de foie élué à 0.03 M (pH 7.2).

L'électrophorèse est conduite dans un tampon Tris 0.04 M pH 7.8, 0.02 M acétate de sodium et 2 mM EDTA pendant 45 min.

FIGURE 13

Détermination du pH de l'inhibiteur extrait de réticulocytes.

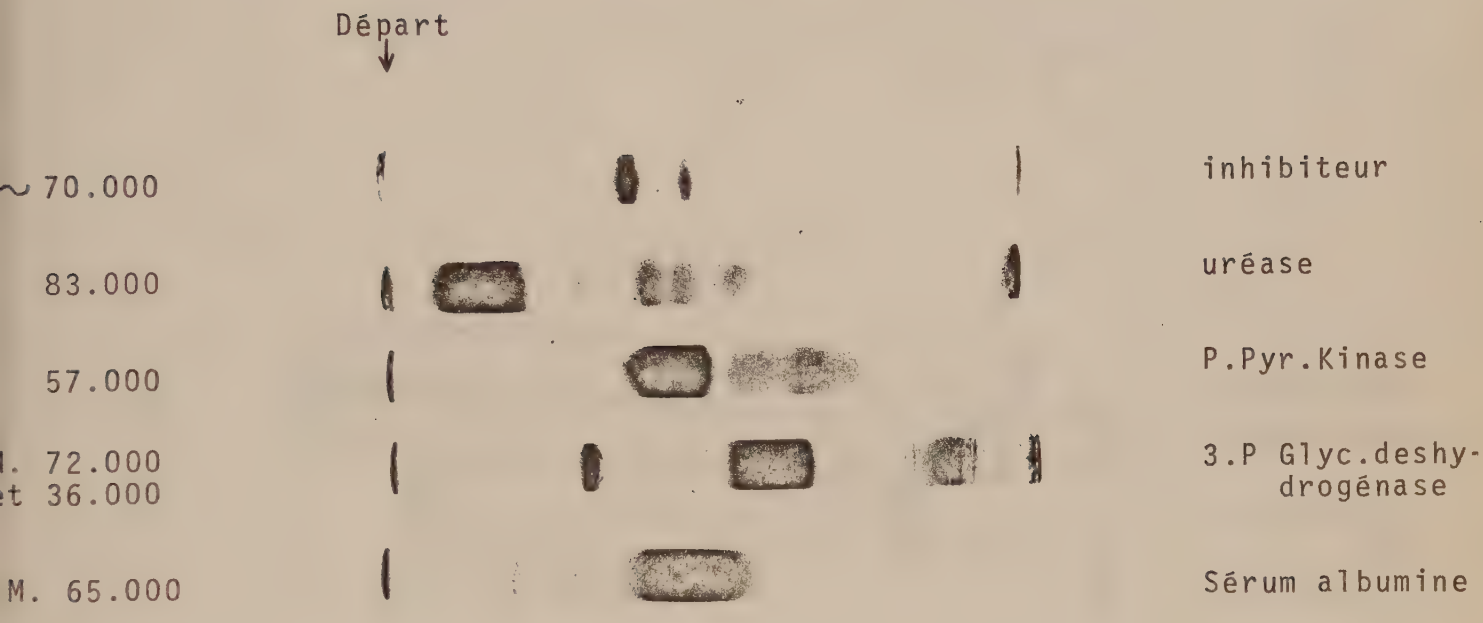
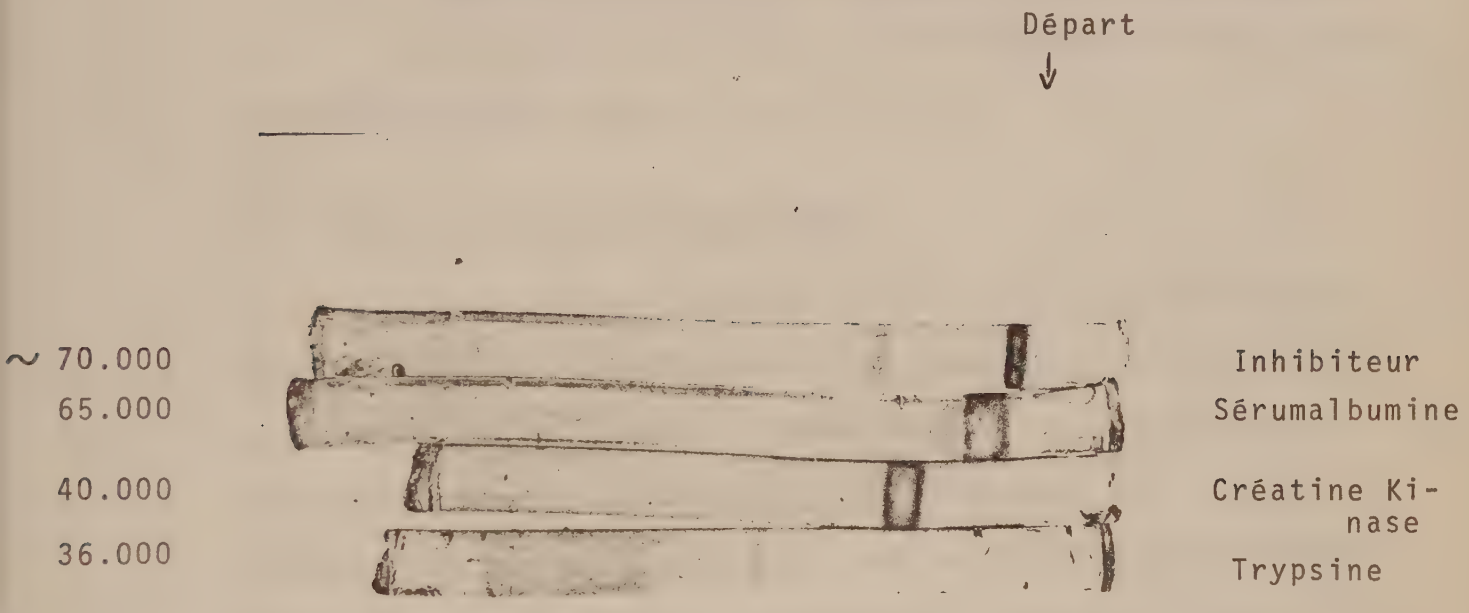


FIGURE 14

Détermination du poids moléculaire de l'inhibiteur extrait de foie



l'inhibiteur extrait de réticulocytes, on obtient un pHi de 5,4 (Figure 15).

b) Avec l'inhibiteur extrait de foie, on lit un pHi aux environs de 5,5 (Figure 16).

4. Composition en acides aminés des deux inhibiteurs

On constate que les 2 inhibiteurs ont un taux élevé en acides aminés acides (Tableau XIII).

IV) SPECIFICITE DES INHIBITEURS

Les inhibiteurs extraits de foie et de réticulocytes ont été ajoutés simultanément aux systèmes acellulaires de réticulocytes et de foie. Comme on peut le constater sur le Tableau XIV, l'inhibiteur extrait de foie n'a aucun effet (sinon légèrement stimulateur) sur la synthèse de sérumalbumine, alors qu'il inhibe fortement la synthèse d'hémoglobine. Par contre, l'inhibiteur extrait de réticulocytes n'a aucun effet sur la synthèse d'hémoglobine et une action inhibitrice puissante sur la synthèse de sérumalbumine.

On peut donc conclure que ces inhibiteurs seraient spécifiques du tissu.

V) MECANISME D'ACTION

Pour des raisons de commodité, nous avons étudié le mécanisme d'action tantôt de l'inhibiteur extrait de foie, tantôt celui extrait de réticulocytes. Lorsqu'il était possible, un certain nombre d'expériences ont été réalisées avec les deux, montrant une identité d'action.

...

FIGURE 15

Détermination du pHi de l'inhibiteur extrait de réticulocytes.

FIGURE 16

Détermination du pHi de l'inhibiteur extrait de foie.

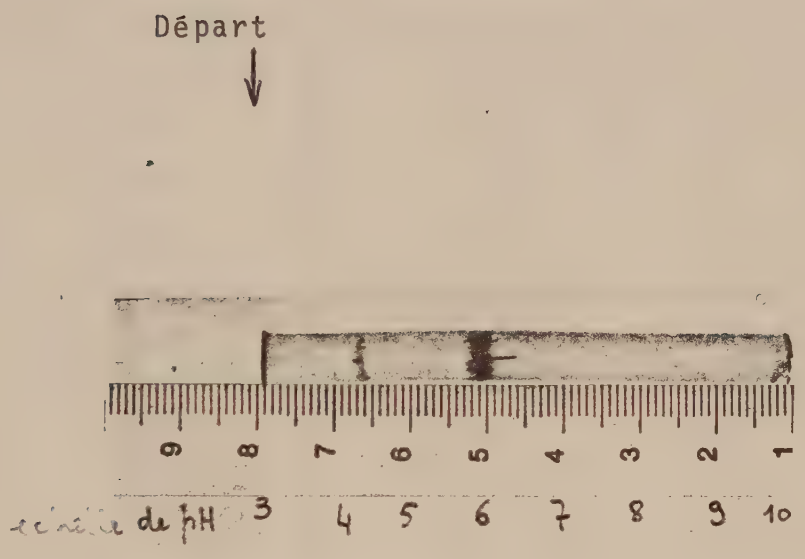


TABLEAU XIII

acides aminés	moles/100 moles I. extrait de rétic.	moles/100 moles I. extrait de foie
LYS	4.1	6.1
HIS	1.8	1.8
ARG	2.4	3.4
AC.ASP	*10.2*	*8.6*
THRE	3.6	5.9
SER	6.1	6.9
AC.GLU	*8.5*	*10.2*
PRO	4	5.8
GLY	6.1	8.1
ALA	5.6	7.4
VAL	4.6	5.3
I.LEU	2.7	3.8
LEU	9.9	7.5
TYR	2.2	3.1
PHE	3	3.4

Composition en acides aminés de l'inhibiteur extrait de foie et de l'inhibiteur extrait de réticulocytes.

TABLEAU XIV

Origine de l'inhibiteur ajouté.	RADIOACTIVITE (C.P.M.)			
	SERUMALBUMINE *(système acellulaire de foie)*		HEMOGLOBINE *(système acel. réticulocytes)*	
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2
témoin	1.800	1.625	37.000	44.000
Foie	2.920	1.310	5.450	5.500
Réticulocytes	418	252	34.200	45.000

Spécificité des inhibiteurs de foie et de réticulocytes. 200 µg de protéines inhibitrices de foie et de réticulocytes sont ajoutées simultanément à un système acellulaire de foie et de réticulocytes.

1. Activité protéolytique des inhibiteurs

En opérant de la manière décrite dans "Méthodes", on n'observe aucune tâche décelable par la coloration à la ninhydrine. On peut conclure qu'au pH de l'incubation, on ne trouve aucune activité protéolytique des inhibiteurs.

2. Action sur les polysomes de foie de l'inhibiteur extrait de réticulocytes.

La préincubation de l'inhibiteur isolé des réticulocytes avec des polysomes de foie ne modifie en rien le profil des polysomes en gradient de saccharose comme l'indique la Figure 17. L'inhibiteur ne semble pas agir sur les ARN messagers liés aux polysomes, il pourrait néanmoins se lier aux ARN messagers libres. Cette observation exclut une fois encore une activité nucléolytique quelconque.

3. Action de l'inhibiteur de réticulocytes sur un système acellulaire de Coli.

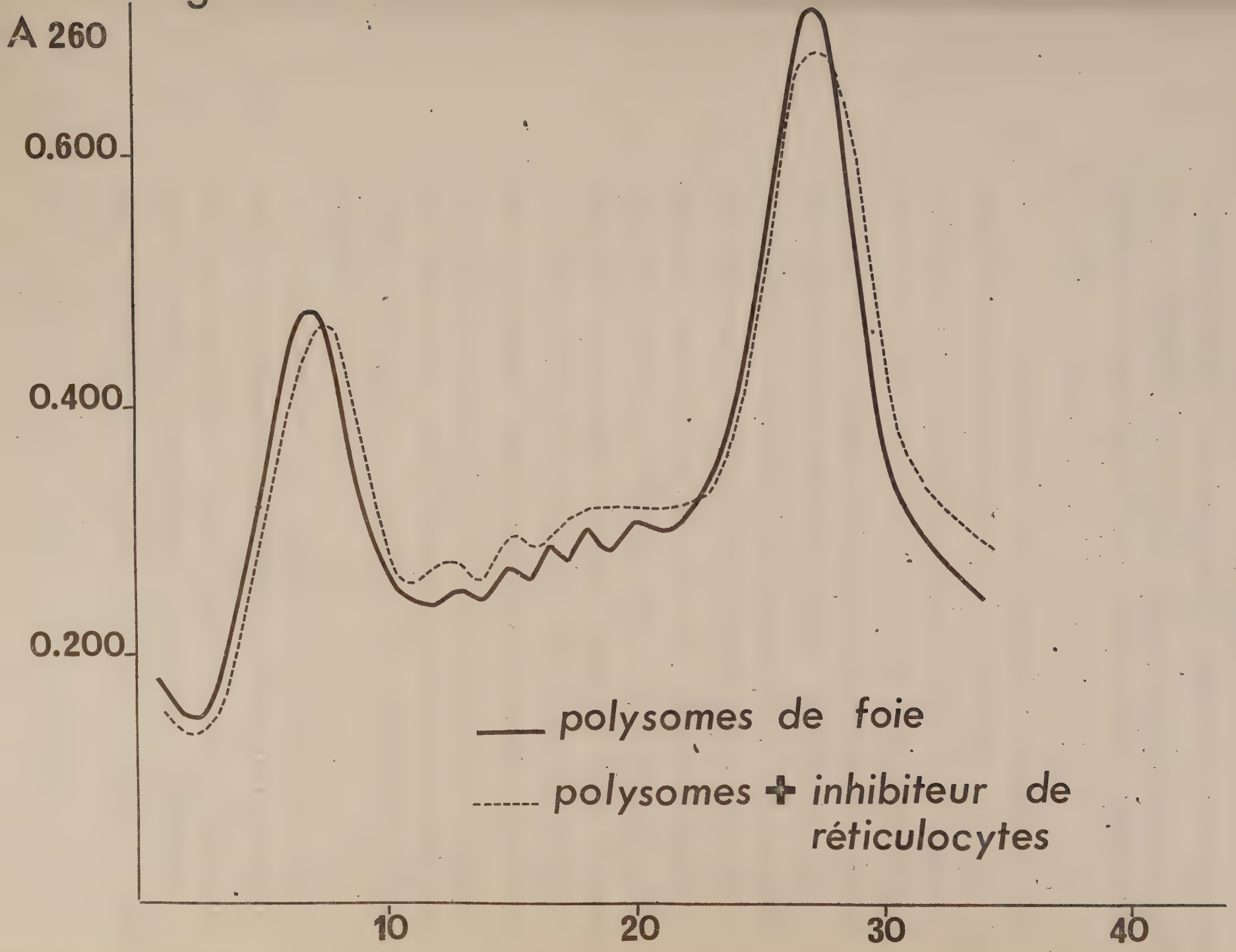
L'inhibiteur isolé des réticulocytes a été ajouté à un système acellulaire de Coli en présence de Poly U et de ^{14}C phénylalanine dans les conditions décrites dans "Méthodes". La radioactivité des protéines précipitées au TCA a été de 9480 c.p.m. contre 9653 c.p.m. en l'absence d'inhibiteur.

Donc l'inhibiteur n'a aucun effet sur le système.

4. Action de l'inhibiteur extrait de foie sur la libération et l'assemblage des chaînes d'hémoglobine.

a) L'apparition de l'hémoglobine dans le milieu com-

...


A 260
0.600
0.400
0.200
10
20
30
40
polysomes de foie
polysomes + inhibiteur de réticulocytes

mence après la 2e minute d'incubation, elle est rapide et linéaire pendant 8 minutes puis la vitesse de formation change ; la synthèse reste linéaire avec le temps pendant au moins encore 50 minutes, mais à une vitesse moindre (Schapira et al. 1961). (Figure 18).

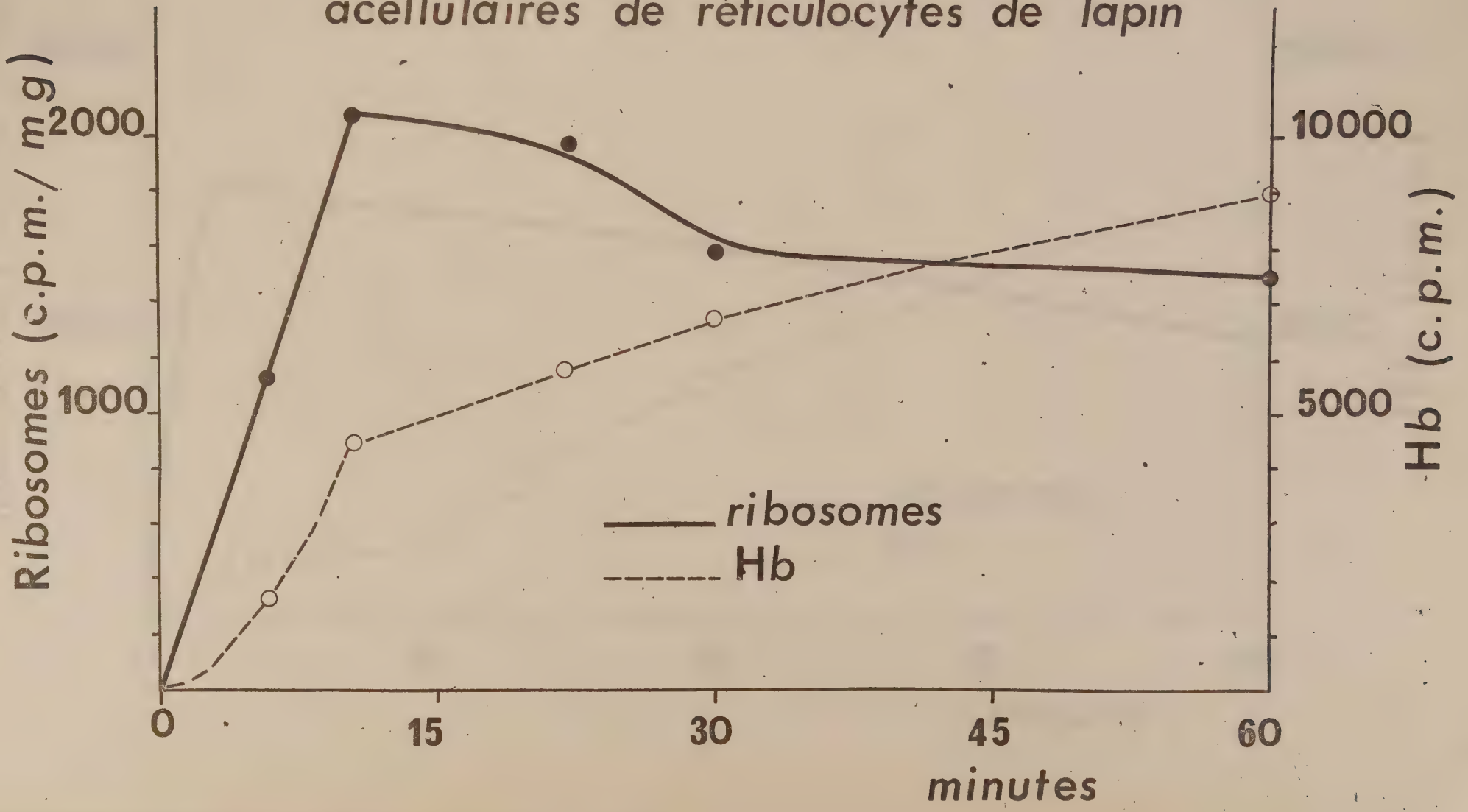
b) Il est possible de distinguer la synthèse de l'hémoglobine par les ribosomes, de sa libération. Pour cela, on fait incuber le système 5 à 10 minutes avec de la Leucine radioactive puis on ajoute une quantité relativement grande de leucine non marquée, qui dilue la radioactivité de sorte que l'hémoglobine synthétisée dans les ribosomes ne sera désormais plus radioactive. On constate que la radioactivité des protéines du ribosome baisse immédiatement selon une cinétique linéaire, alors que celle de l'hémoglobine après un temps de latence de 10 minutes monte progressivement selon une cinétique également linéaire (Figure 18 bis). Les ribosomes ont ainsi continué à libérer une hémoglobine radioactive, dont la synthèse s'était effectuée à un moment où les ribosomes étaient en présence de Leucine marquée. Le processus de libération met peut-être en partie en jeu une dégradation partielle du ribosome et probablement un processus enzymatique complexe.

Pour vérifier que l'inhibiteur n'agissait pas au niveau de la libération, on a ajouté 200 µg d'inhibiteur extrait de foie, soit en début d'incubation, soit 10 minutes après le début de l'incubation. On constate (Tableau XV) que l'inhibiteur agit seulement lorsqu'il est ajouté au début.

...

Fig. 18

Cinétique de l'incorporation de C^{14} leucine dans les ribosomes et l'Hb de systèmes acellulaires de réticulocytes de lapin



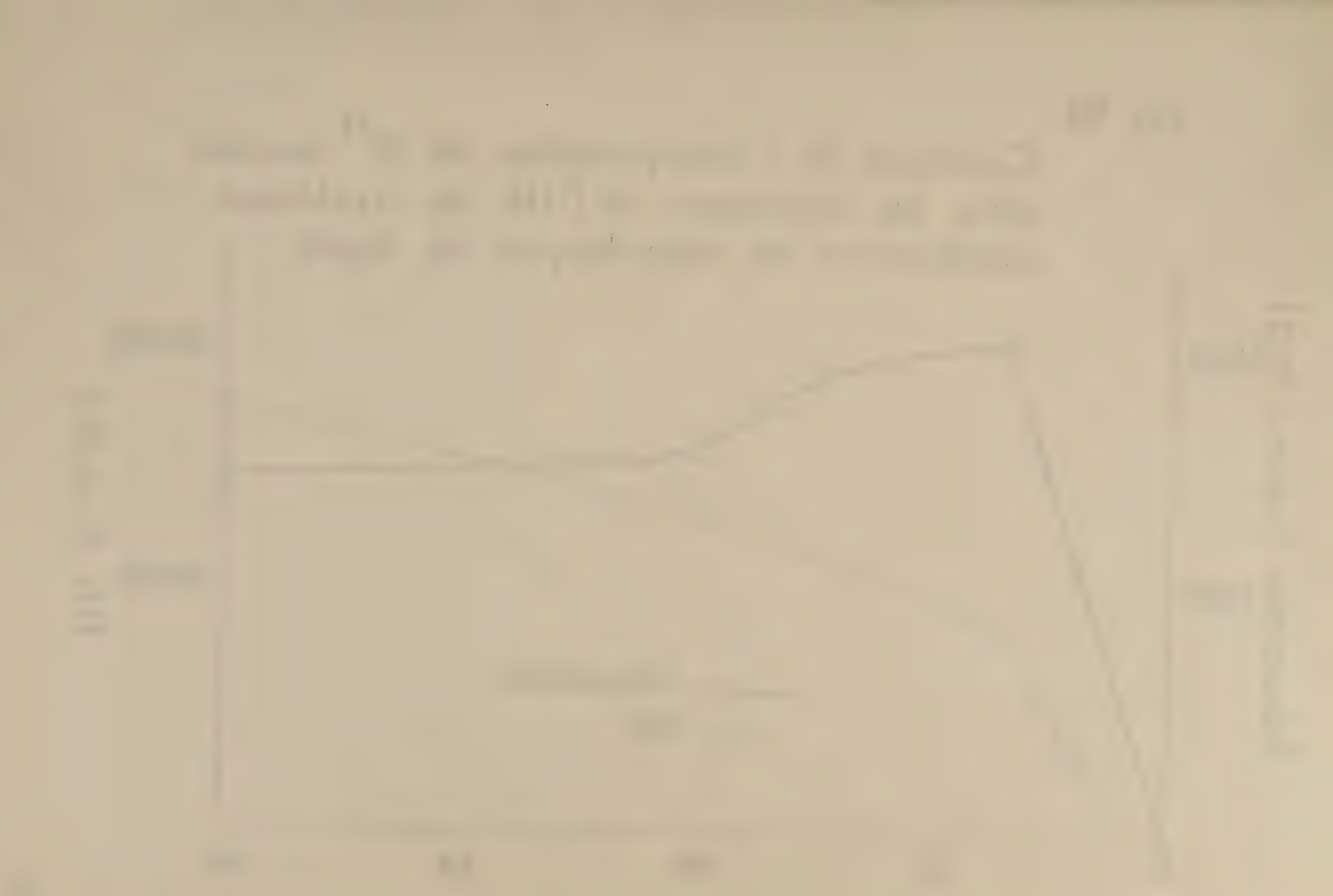


Fig. 18 BIS

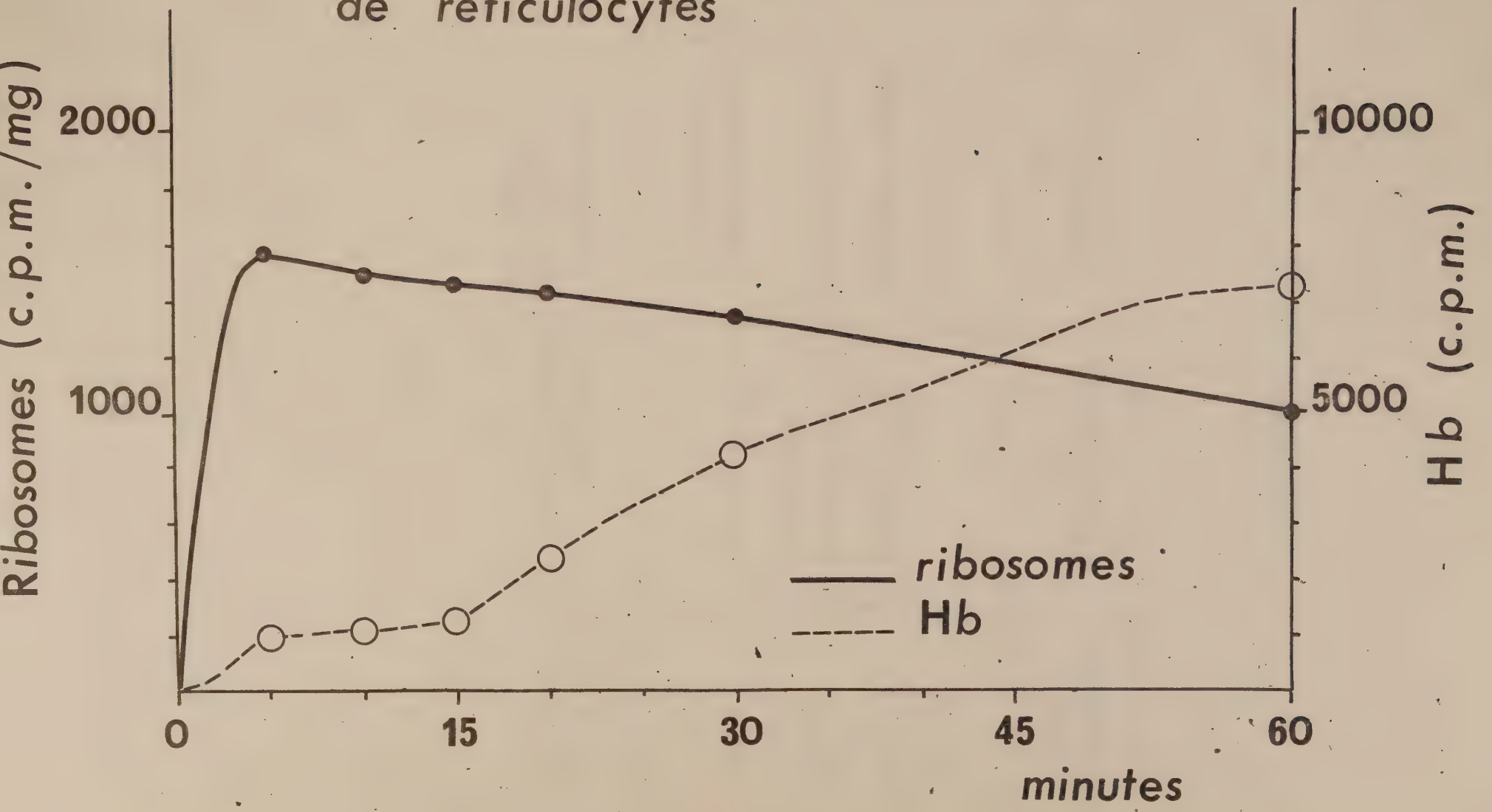

Libération d' Hb par les ribosomes de réticulocytes
Ribosomes (c.p.m./mg)
2000
1000
10000
5000
Hb (c.p.m.)
ribosomes
Hb
0
15
30
45
60
minutes

TABLEAU XV

Première partie de l'incubation 10'	Deuxième partie de l'incubation 50'	Hémoglobine (c.p.m.)
Système complet		39.700
Système complet	+ $[^{12}C]$ leucine	29.700
Système complet	+ $[^{12}C]$ leucine + inhibiteur	29.300
Système complet + inhibiteur	+ $[^{12}C]$ leucine	8.450

Action de l'inhibiteur sur la libération et la synthèse de l'hémoglobine par les ribosomes de réticulocytes.

Il semble donc n'avoir aucun effet sur la libération et l'assemblage des chaînes d'hémoglobine.

5. Action des inhibiteurs sur les ARN

a) Sur le profil d'ARN en gradient de saccharose

L'inhibiteur extrait de réticulocyte modifie le profil des ARN de foie dans la région comprise entre 18 S et 4 S qui correspond à la région qui contient les ARN messagers, alors que l'inhibiteur issu du foie a un effet moindre sur ces ARN comme nous le montre la figure 19. Cette perturbation du profil de sédimentation des ARN peut signifier soit une destruction, soit une combinaison de l'inhibiteur avec ces polynucléotides. Bien que certaines expériences décrites précédemment ont montré l'absence d'action nucléasique dans les inhibiteurs, nous avons utilisé néanmoins d'autres méthodes de recherche d'une action non spécifique éventuelle.

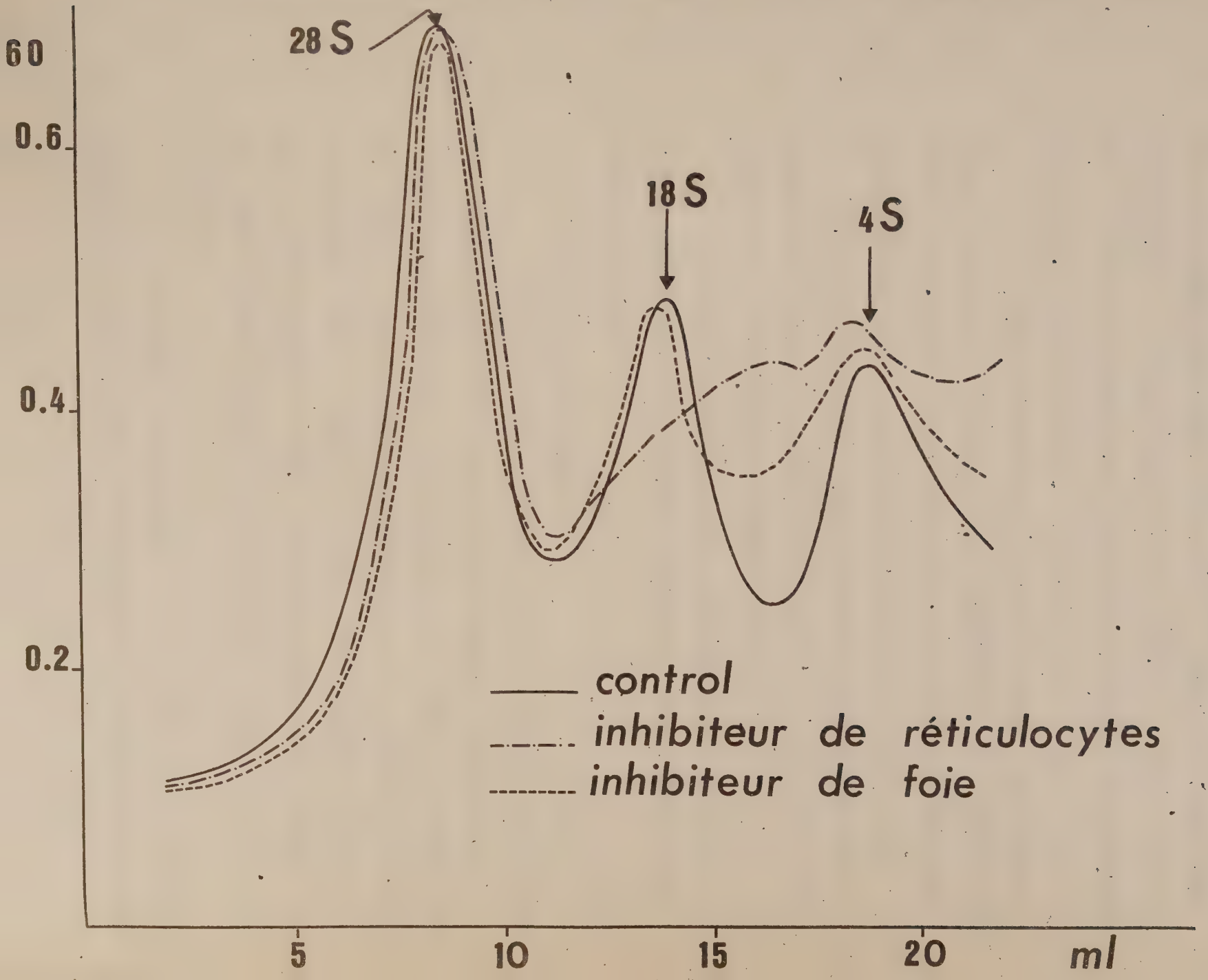
b) Sur l'ARN de levure

2 mg d'ARN de levure ont été incubés avec 400 µg de chacun des deux inhibiteurs pendant 25 minutes à 37°. Le matériel acido soluble libéré a été traité par la méthode d'Anfinsen et al. 1954, légèrement modifiée (Kruh et al. 1968). Il a été vérifié que cette méthode permettait de mettre en évidence 0,01 µg de ribonucléase pancréatique alors qu'on a montré, dans nos conditions d'expériences (voir Méthodes), qu'il fallait ajouter 0,2 µg de RNase pour observer une inhibition de synthèse et 0,1 µg pour modifier le comportement de l'ARN sur gradient de saccharose.

c) Action de l'inhibiteur de foie sur la formation d'acyl tARN

...

réticulocytes sur le gradient d'ARN de foie



L'incubation contient 50 µg d'inhibiteur extrait de foie, 1 mM Tris (pH 7,4), 1 mM d'acétate de Mg, 0,04 mM ATP, 0,2 mM β mercaptoéthanol, 100 µg de surnageant S 150 de Coli, 40 µg de tARN, 2 mµ moles de Leu. C^{14} (activité spécifique 130 mCi/mM). L'incubation se fait pendant quinze minutes à 37°. Elle est arrêtée par 2 ml de TCA 10 % et la suspension est filtrée sur Millipore.

Lorsqu'on compare ces incubations avec des témoins sans inhibiteur, on observe une augmentation de l'aminoacylation, probablement due à une protection non spécifique des tARN ou bien de la Leucyl tARN synthétase (Tableau XV).

Cette expérience exclut l'idée d'une inhibition au niveau de l'étape initiale de la synthèse protéique (c'est-à-dire de l'activation des amino acides).

Dans ces conditions, on a observé que la fraction acido soluble de l'incubation contenant l'inhibiteur n'absorbe pas à 260 mµ.

d) Sur l'ARN de TYMV

100 µg d'ARN de TYMV (6 mg/ml) dissous dans du tampon cacodylate 0,01 M (pH 6) sont incubés 10 minutes à 37° avec 50 µg d'inhibiteur de réticulocytes dans un volume final de 0,2 ml. La solution est déposée sur un gradient linéaire de sucrose 5-20 %. Après 16 h de centrifugation à 17.000 g dans un rotor Spinco SW 39, les échantillons sont recueillis et leur absorption à 260 mµ déterminée, comme l'indique la Figure 20.

Le profil de sédimentation de l'ARN est le même en présence et en l'absence d'inhibiteur ce qui exclut un effet

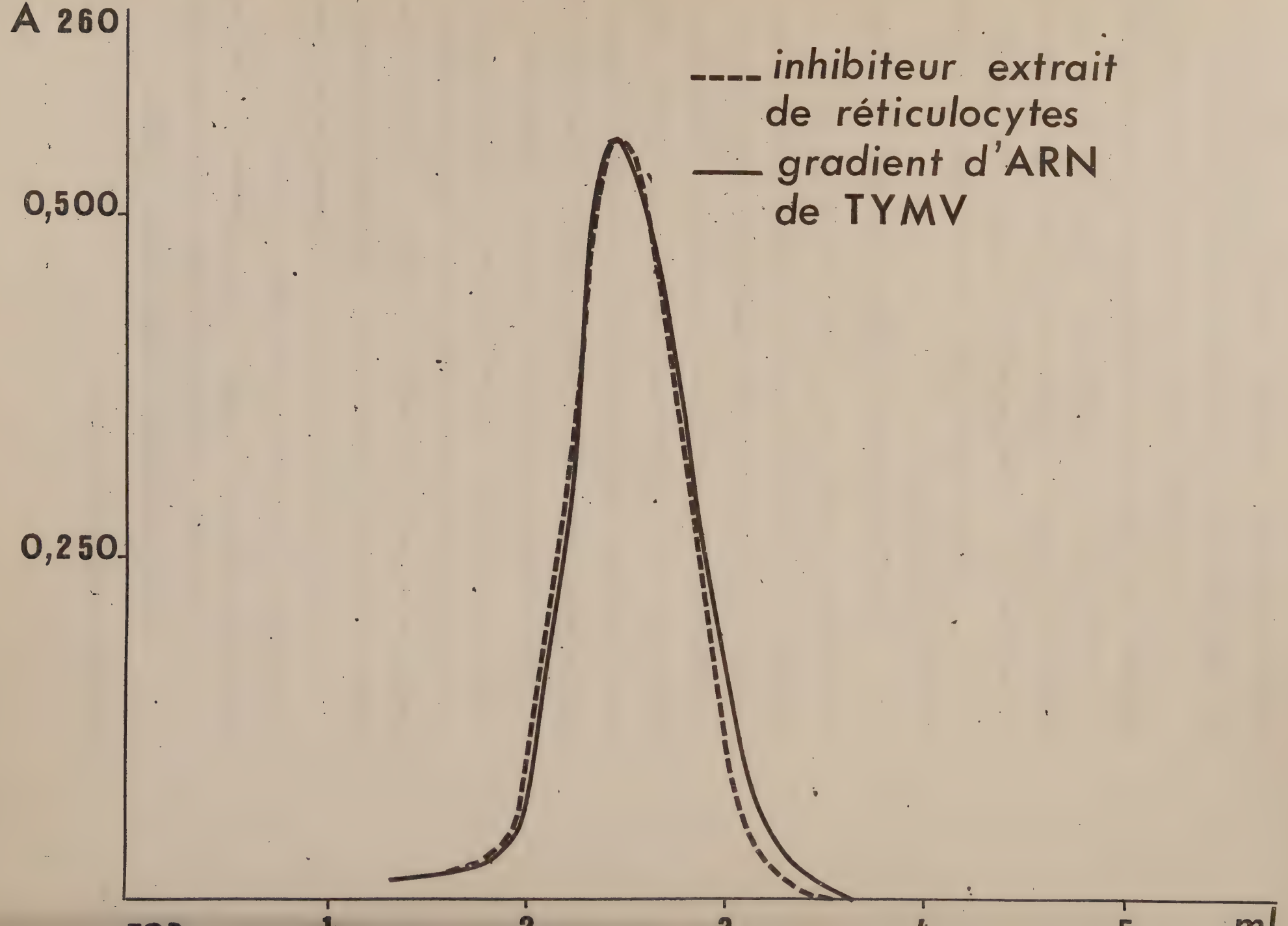
...

TABLEAU XVI

Expériences N°	^{14}C LEUCYL tARN FORME (C.P.M.)	
	En l'absence de l'inhibiteur	En présence de l'inhibiteur
I	8.379	16.320
2	2.838	5.799
3	2.336	4.214

Formation de Leucyl tARN en présence d'inhibiteur de foie.

Fig. 20


A 260
0,500
0,250
---- inhibiteur extrait de réticulocytes
—— gradient d'ARN de TYMV
1
2
3
4
5
ml

nucléolytique non spécifique.

e) Sur la formation d'acétyl leucyl ^{14}C tARN

Bien que l'inhibiteur ne semble avoir aucun effet sur l'amino acylation du tARN, il était nécessaire d'exclure la possibilité qu'il puisse hydrolyser le tARN.

Le ^{14}C Leucyl tARN de E Coli préparé selon la méthode de Nathans et Lipmann (1961) a été acétylée selon la technique de Haenni et Chapeville (1966). 50 µg de ce composé sont incubés pendant quinze minutes à 37° en présence de 50 µg d'inhibiteur de foie, soit dans du Tris à pH 7,2, soit dans du barbital à pH 8 et le tout est soumis à une électrophorèse dans de l'acide formique 0,5 M pendant 90 minutes à 20 V/cm selon Chapeville et al. (1969). Par autoradiographie, on décèle suelement une tâche au point de départ contenant l'ac-C^{14} leucine et correspondant à l'échantillon intact. Si l'inhibiteur avait une activité nucléolytique, on aurait pu s'attendre à observer plusieurs tâches correspondant aux différents ac-^{14}C leu-oligonucléotides.

f) Sur l'ARN de réticulocytes actif dans la synthèse in vitro d'hémoglobine

Il a été montré il y a quelques années la présence de messagers 9 S d'hémoglobine dans l'ARN de réticulocytes (Kruh et al. 1964) et (Schapira et al. 1966) qui stimulerait la synthèse in vitro d'hémoglobine. Cette stimulation est empêchée par l'addition d'inhibiteur extrait de foie.(Tableau XVII).

Pour essayer de voir s'il s'agit d'une destruction de l'ARN messager ou d'interaction entre l'inhibiteur et le mARN, on a incubé l'inhibiteur extrait de foie avec l'ARN

...

TABLEAU XVII

	Quantité de RNA(4S-16S) en µg	Quantité d'inhibiteur en µg	Hémoglobine c.p.m.
Système complet	0	0	20.600
Système complet	300	0	32.400
Système complet	0	300	5.600
Système complet	300	300	5.700

Action combinée de l'ARN (4S - 16S) et de l'inhibiteur sur la synthèse de l'hémoglobine dans un système acellulaire de réticulocytes.

messager, puis procédé à une extraction au phénol afin de séparer la protéine éventuellement combinée à l'ARN. Ce dernier est de nouveau testé dans le système acellulaire et son activité est conservée comme on peut le constater dans le Tableau XVII.bis.

On peut donc conclure que l'inhibiteur n'agit pas en dégradant l'ARN, et compte tenu de la modification qu'il apporte à profil de l'ARN contenu dans la fraction III (voir Figure [19]), il agirait plutôt en se combinant à l'ARN.

6. Formation d'un complexe ARN-inhibiteur

a) Inhibiteur extrait de réticulocytes et ARN de foie

L'inhibiteur extrait de réticulocytes est incubé avec les différentes fractions d'ARN marqué au ^{3}H et isolées sur gradient de saccharose.

L'inhibiteur a une affinité plus grande pour l'ARN III qui sédimente entre 18 S et 4 S, comme on peut le constater sur le Tableau XVIII.

b) ARN III de foie et différentes fractions de pH 5 de réticulocytes

L'ARN III de foie marqué au ^{3}H est incubé avec le pic I de l'éluat à 0,02 M du pH 5 de réticulocytes et avec les autres protéines éluées qui précèdent et qui suivent le pic inhibiteur.

On constate (Tableau XIX) que c'est le pic I qui a la plus forte affinité pour l'ARN III.

...

TABLEAU XVIIbis

Milieu d'incubation	Synthèse d'hémoglobine (c.p.m.)
Témoin · sans ARN sans inhibiteur	18.000
400 µg ARN de réticulocytes	70.000
200 µg Inhibiteur de foie	3.010
400 µg ARN réticulocytes 200 µg Inhibiteur foie	2.950
400 µg ARN rétic. préincubés avec l'inhibiteur de foie et purifiés.	66.000

Action de l'inhibiteur extrait de foie incubé avec l'ARN de réticulocytes sur la synthèse d'hémoglobine dans un système acellulaire de réticulocytes.

TABLEAU XVIII

Nature de ^{3}H - ARN	Radioactivité de 100 µg de ^{3}H-ARN *(c.p.m.)*	Complexe ^{3}H-ARN-Inhibiteur *(c.p.m.)*	Quantité d'ARN liée à 100 µg d'Inhibiteur.
28 S	7.460	670	9.0
18 S	3.250	450	13.8
ARN III	5.000	1.200	24.0
4 S	2.740	225	8.2

Action de différentes fractions de ^{3}H-ARN de foie obtenues sur gradient de saccharose avec l'ARN de réticulocytes.

TABLEAU XIX

Fraction de protéine	Radioactivité de 100 µg de ^3H ARN III *(c.p.m.)*	^3H Complexe ARN-protéines *(c.p.m.)*	Quantité d'ARN liée à 100 µg de protéine
Eluat du pic I 0.02 M	5.000	1.200	24
Eluat du pic II 0.02M	5.000	294	5.9
Eluat 0.03 M	5.000	190	3.8

Action de l'ARN III de foie (marqué au ^3H) avec plusieurs fractions de protéines extraites de la fraction pH 5 sur colonne de DEAE cellulose.

c) Inhibiteur de réticulocytes et de ^{14}C-Val-ARN de TYMV

100 g d'inhibiteur de réticulocytes sont incubés avec 37 µg de ^{14}C-Val-ARN de TYMV (1128 c.p.m.). Le complexe est précipité et passé sur filtre Millipore. La radioactivité que l'on recueille sur les filtres est de 293 c.p.m. correspondant à 9,6 µg d'ARN. En l'absence d'inhibiteur, aucune radioactivité n'est détectée. L'affinité de l'inhibiteur pour l'ARN de TYMV n'est pas négligeable.

D I S C U S S I O N

Une protéine soluble de foie inhibant la synthèse d'hémoglobine dans un système acellulaire de réticulocytes et une protéine soluble de réticulocytes inhibant la synthèse de sérum albumine dans un système acellulaire de foie ont été mises en évidence.

Kruh et al. (1966) ont montré dans un travail antérieur que la fraction d'ARN sédimentant entre 4 et 9S extraite du noyau de foie de lapin activait la synthèse d'hémoglobine dans le système acellulaire de réticulocytes. Dernièrement, Williamson et al. (1972) ont montré la présence d'ARN messager de la globine dans le noyau de foie embryonnaire de souris.

Le foie adulte pourrait donc contenir des ARN's messagers de protéines qui ne lui sont pas spécifiques. On pourrait supposer que leur traduction éventuelle serait empêchée par des protéines spécifiques contenues dans la fraction cellulaire soluble. En effet, les expériences de Gurdon (1968) permettent de penser que l'ADN des cellules différenciées contient la totalité du capital génétique de l'individu : En remplaçant le noyau d'un oeuf de batracien détruit par radiation par un noyau d'une cellule différenciée provenant d'épithélium d'intestin, l'auteur constate que dans un certain nombre de cas, l'oeuf se développe en donnant naissance à un animal normal. La totalité de l'information génétique de l'individu étant présente dans l'ADN des cellules différenciées,

...

son expression est sous le contrôle de constituants cytoplasmiques. Dans ce cas, on pourrait penser que la régulation est essentiellement post transcriptionnelle chez les eucaryotes et que c'est à une étape ultérieure que la restriction de l'expression génétique s'opère. Mais le modèle d'ADN suggéré par Crick en 1971 nous montre qu'il en est autrement. Ainsi, pour cet auteur, l'ADN aurait une double fonction :
A la structure en double hélice de ce dernier, se superpose une structure tertiaire. Ainsi, le DNA serait composé de zones fibreuses formées de deux doubles hélices, comprenant environ 3% de la molécule, qui contiendraient les parties codantes et de zones globulaires, qui seraient responsables du contrôle et de la régulation. D'où on peut penser qu'une même molécule d'ADN aurait des structures tertiaires différentes selon le type de cellules, c'est-à-dire qu'elle serait capable de spécifier des évènements différents. L'interaction de l'ADN avec les histones interviendrait dans la structure tertiaire.

Une première sélection des protéines synthétisées peut déjà se situer à ce niveau. En effet, un rôle fondamental dans le mécanisme de régulation au niveau de la transcription a été attribué aux histones (Huang et al. 1962) (Alfrey et al. 1963). Ces dernières agiraient en réduisant la capacité de l'ADN de servir de matrice pour la transcription en stabilisant sa structure bihélicoïdale, ce qui empêcherait la RNA polymérase d'agir. Par ailleurs, les histones peuvent également se combiner aux ARN ; en effet, ajoutées à des systèmes acellulaires de réticulocytes, elles inhibent la synthèse de l'hémoglobine

...

(Kruh et al. 1968) (Dastugue et al. 1970 a.).

Cependant l'étude des différentes fractions d'histones provenant de différents organes ainsi que la comparaison de la composition en acides aminés montrent que les histones ne possèdent qu'une faible spécificité d'organe (Vendrely et al. 1966) (Kruh et al. 1968). On a pu montrer (Kleinsmith et al. 1966) (Steveley et al. 1968) que lorsque l'histone était phosphorilée en présence d'ATP et d'histone kinase, elle perdait en partie son pouvoir inhibiteur. Il semble également que l'acétylation des histones en présence de transacétylases et d'acétyl CoA leur fasse perdre leur pouvoir inhibiteur. Gallwitz 1971 a montré qu'il existait une spécificité d'organe de ces histones transacétylases ; ces enzymes fixent des radicaux acétyls sur des restes différents d'acides aminés dans les histones. Nos connaissances sur la structure des ARN polymérases ne sont pas suffisantes pour savoir si elles jouent un rôle dans la reconnaissance des fragments de DNA qui sont susceptibles d'être transcrits dans une cellule donnée. En particulier, on ne sait pas si un facteur analogue au facteur σ trouvé dans l'ARN polymérase bactérienne existe également dans les cellules animales. Ainsi, J.L. Mandel et P. Chambon (1971) n'ont pu mettre en évidence de spécificité tissulaire de l'ARN polymérase animale. Par contre, des facteurs influençant de manière spécifique l'activité des ARN polymérases ont été découverts par Stein et Hausen (1970) :-une ribonucléase spécifique attaquerait l'ARN synthétisé à partir d'ADN dénaturé, mais non l'ARN synthétisé sur l'ADN natif.

...

- un facteur protéique isolé de thymus de veau stimulerait un certain type de polymérases de ce tissu.

On a des raisons de croire que d'autres protéines présentes dans la chromatine pouvaient être responsables du contrôle spécifique de l'expression génétique. Dans ce domaine, les protéines non histones ou protéines acides ont été étudiées dans plusieurs laboratoires et il est généralement admis que ces protéines confèrent une spécificité à la transcription. L'image électrophorétique de ces protéines varie d'un tissu à l'autre (Dastugue et al. 1970 b) (Loeb et al. 1969). Par ailleurs des expériences de double marquage ont permis de montrer que les protéines non histones se renouvelaient rapidement (Dastugue et al. 1971 a). Toutefois, leur capacité de se combiner spécifiquement à certaines histones en levant l'inhibition non spécifique due à ces dernières (Gilmour et al. 1970) est le phénomène le plus intéressant ; l'hybridation des ARN synthétisés en présence de nucléohistones et de protéines non histones de différentes origines tissulaires met en évidence le fait que les protéines non histones modifient la transcription et que cette modification serait spécifique du type de tissu dont elles proviennent.

Il a été montré également que des hormones se fixaient de manière spécifique aux protéines non histones (Siebert et al. 1971) (Dastugue et al. 1971 b).

Chytil et Spelsberg (1971) ont montré des différences antigéniques entre les complexes ADN-protéines acides des différents tissus. Kleinsmith et al. (1970) ont mis en évidence

...

cette spécificité en isolant par chromatographie d'affinité une fraction protéique acide à partir de foie de rat qui ne se combine qu'à l'ADN de foie de rat et non à l'ADN d'autres organes.

Par ailleurs, il a été prouvé que l'ARN à renouvellement rapide du noyau était beaucoup plus long que le messager que l'on peut obtenir des polysomes (Attardi et al. 1966) (Scherrer et al. 1966). Les études de ces auteurs sur les érythroblastes d'aviaires ont montré qu'une grande partie de l'ARN nucléaire ne sert pas de matrice pour la synthèse protéique. En effet, ces cellules ne synthétisent que de l'hémoglobine et la longueur de cet ARN est beaucoup plus grande que celle de l'ARN messager de l'hémoglobine. L'ARN nucléaire n'est donc pas formé uniquement de précurseurs d'ARN messagers et d'ARN ribosomal, il comprend des fragments de signification encore inconnue mais qui peuvent jouer un rôle dans le contrôle génétique. Ces ARN géants sont découpés par des enzymes spécifiques et une partie est détruite sur place, le reste de l'ARN se combine à des protéines, puis est transféré dans le cytoplasme. Harris (1963) avait déjà constaté par des expériences de marquage qu'une grande partie de l'ARN nucléaire était détruite jusqu'au stade acide soluble et ne franchissait jamais la membrane nucléaire. Drews et al. (1968) ont montré que la nature des ARN qui franchissaient la barrière nucléaire était fonction de l'état de croissance de la cellule. Ainsi dans les hépatomes, la plupart des espèces d'ARN nucléaires sont transférés dans le cytoplasme, alors que seule une petite

...

fraction de ces ARN franchissent la membrane nucléaire dans le foie normal. Le foie en régénération présente une situation intermédiaire. Ceci tendrait à démontrer qu'il existe bien un contrôle au niveau du transfert des ARN nucléaires. Ce contrôle pourrait être assuré de plusieurs manières :

- par une destruction des ARNm modulée par des nucléases spécifiques.
- par une perméabilité sélective au niveau de la membrane nucléaire.
- par une protection spécifique des ARNm par des particules protéiques.

En effet, il a été montré que l'ARN messager était lié à des particules protéiques. Ces complexes ont été dénommés "informosomes" (Spirin 1966). Moulé et al. (1968) ont montré qu'ils contenaient 11 % d'ARN et 89 % de protéines. La fraction protéique liée à l'ARN a été étudiée par Georgiev (1967) et appelée informofer. Dans les polysomes, un traitement par l'EDTA libère également de l'ARNm lié à des protéines.

Les "informosomes" ont été isolés dans différents types de cellules ; Samarina et al. (1968) ont montré que les fractions protéiques avaient une mobilité identique sur gel d'acrylamide quelle que soit leur origine tissulaire.

Les protéines liées aux ARN messagers et extraites des polysomes de différents tissus présentent une distribution hétérogène sur gel d'acrylamide. (Lukamidin et al. 1971). Henshaw (1968) a comparé les protéines de l'informosome et

...

celles liées aux ARNm dans les polysomes ; l'analyse sur CsCl a montré qu'elles migraient dans la même zone de densité. Mais ces protéines n'ont pas été identifiées. Morel et al. (1971) ont montré cependant, dans les cellules aviaires, qu'il existait des différences dans les protéines extraites des ARNm du noyau et celles extraites des ARNm du cytoplasme. La question de savoir si les complexes ribonucléoprotéiques du noyau et du cytoplasme sont identiques n'est donc pas encore actuellement résolue. Un rôle fondamental est attribué à la protéine de l'informosome dans le contrôle génétique. Les informosomes seraient une forme de transport des ARNm du noyau vers le cytoplasme et vers les polysomes. Ils joueraient un rôle de protection passive et de stabilisation des ARNm vis à vis des enzymes ; effectivement, les informosomes sont moins sensibles à l'action de la Rnase pancréatique que ne le sont les ARNm libres. Si l'informosome possède un rôle sélecteur spécifique (Spirin 1966), les complexes stables ne pourraient se former qu'avec un certain type d'ARNm qui seraient les seuls à être traduits. Les ARN messagers ne sont pas formés seulement de régions codant pour les protéines ; on sait que les régions codantes doivent commencer par un codon initiateur AUG ou GUG et finir un codon de terminaison de chaîne UAG, UAA ou UGA. L'application de la méthode de Sanger pour la détermination de la séquence des nucléotides a permis de montrer sur différents ARN que les codons initiateurs n'apparaissaient que plusieurs dizaines de nucléotides après l'extrémité 5' terminale de la chaîne.de l'ARN. Les premiers messagers animaux qui ont été

...

isolés à l'état pur sont ceux codant pour les chaînes α et β de l'hémoglobine de souris et de lapin. Labrie (1969) et Gaskill et al. (1971) ont montré que ces messagers étaient plus longs que ne l'exigeait le codage des chaînes de globine. Williamson et al. (1971) ont trouvé un P.M. de 170.000 -8000 ; ce qui correspond à un supplément de 70 nucléotides. Si cette partie supplémentaire est localisée dans la partie antérieure 5' du messager, on peut penser qu'elle intervient dans sa fixation sur le ribosome. On a mis en évidence aussi bien sur l'ARN nucléaire que cytoplasmique des régions très riches en Adénine (Lee et al. 1971). Cela avait été vérifié pour l'ARN 9S de réticulocytes par Lim et al. (1970). Dans les cellules d'ascites, le poly A représente 150 à 200 nucléotides, si bien que l'on doit admettre que la partie codante de l'ARNm est en général précédée ou suivie de régions qui pourraient intervenir dans le processus de régulation. Ces régions peuvent en partie déterminer si un messager sera traduit ou non sur le ribosome ou s'il se combinera à des facteurs régulateurs parmi lesquels, on trouverait des inhibiteurs cytoplasmiques qui ont été étudiés dans ce travail. Ainsi, les messages génétiques ne seraient que partiellement traduits dans une cellule donnée.

Les travaux de Ames et al. (1963) et de Stent (1964) permettent de penser que les ARN de transfert pourraient jouer également un rôle régulateur. Ainsi, ils interviendraient dans le processus de différenciation de la synthèse protéique. De

...

nombreux acides aminés sont codés par plusieurs triplets. Ces triplets correspondent à plusieurs tARN spécifiques d'un même acide aminé, les tARN isoaccepteurs. Si le tARN isoaccepteur correspondant à un triplet rare est absent d'une cellule, l'ARNm contenant le triplet ne sera pas traduit dans la cellule. (Sueoka et al. 1970). S'il est présent en petite quantité, il contrôlera le taux de synthèse d'une protéine. Ainsi, la synthèse d'une protéine peut dépendre de la synthèse d'un seul ARN de transfert. On a trouvé de très nombreuses variations de la distribution des lysyl-tARN au cours du développement embryogénique chez l'oursin (Yang et al. 1968). De même, si l'on compare des cellules normales et cancéreuses, on trouve dans de nombreux cas des profils différents pour les tARN (Mushinski et al. 1969). Ces résultats sont en faveur d'une distribution des tARN isoaccepteurs différente d'un tissu à l'autre.

Par ailleurs, l'ARNt est synthétisé sur l'ADN comme les autres ARN mais pas sous sa forme définitive. Les transformations qu'il subit peuvent être également soit l'origine soit la conséquence d'une régulation.

Ces modifications sont de plusieurs ordres :

- Le tARN contient un excès de nucléotides ; ainsi, le tARN de la tyrosine a 41 bases supplémentaires du côté 5' et 3 du côté 3'.
- Le tARN possède environ 20 % de bases rares dont un grand nombre est méthylé (Soll 1971).

...

On a mis en évidence des méthylases spécifiques de chacune des bases dans les noyaux cellulaires. Dans les cellules cancéreuses, Craddock (1970) a montré qu'il y avait un changement de spécificité de ces méthylases accompagnée d'une très forte augmentation d'activité de ces enzymes.

En conclusion, on peut constater la diversité des mécanismes de contrôle de la synthèse protéique qui pourraient intervenir dans les différentes cellules possédant toutes au départ le même potentiel génétique.

Un de ces mécanismes pourrait être une sélection des ARNm par les inhibiteurs cytoplasmiques. Ces inhibiteurs seraient absents des cellules non ou peu différenciées, par exemple du foie embryonnaire qui synthétiserait de l'hémoglobine, comme l'a montré Williamson et al. (1972), de l'oeuf de batracien et des cellules cancéreuses. Les expériences de Lane et al. (1971) apportent des arguments indirects en faveur de cette hypothèse : en injectant de l'ARN messager d'hémoglobine de lapin à des oocytes de grenouille, les auteurs ont mis en évidence la synthèse d'hémoglobine de lapin ce qui démontrerait qu'aucun constituant cytoplasmique des oocytes de batracien n'a empêché la traduction du messager d'hémoglobine de Mammifère.

Dans notre laboratoire, quelques résultats préliminaires sur des hépatomes de souris nous ont permis de vérifier l'absence d'inhibition de synthèse d'hémoglobine par un extrait de pH 5 d'hépatome dans un système acellulaire de réti-

...

culocytes de lapin. On peut penser qu'au cours de l'organogénèse, l'influence cytoplasmique deviendrait plus importante ; des facteurs tels que pH, hormones etc entraîneraient la synthèse de protéines spécifiques qui empêcheraient la traduction des ARNm non spécifiques d'un organe donné.

Tout un ensemble de mécanismes, encore en grande partie hypothétiques, contribuerait au phénomène très complexe de la différenciation cellulaire.

R E S U M E

Des mécanismes de sélection des ARN au niveau de la transcription et au niveau de la traduction des protéines chez les eucaryotes ont donné lieu à de nombreux travaux, au cours de ces dernières années. Les résultats de tous ces travaux tendent à démontrer que de très nombreux mécanismes sont impliqués dans la régulation qualitative et quantitative de la synthèse protéique dans les cellules animales différenciées.

Nous avons isolé une protéine soluble de réticulocytes qui inhibe la synthèse de sérumalbumine dans un système acellulaire de foie et une protéine soluble de foie qui inhibe la synthèse d'hémoglobine dans un système acellulaire de réticulocytes.

Quelle pourrait être la signification biologique de ces inhibiteurs ? Nous avons cherché un mécanisme d'action qui soit spécifique. Les inhibiteurs n'exercent aucune action sur la synthèse d'amino acyl tARN, ni sur la libération et l'assemblage des chaînes polypeptidiques. Comme les facteurs d'élongation ne sont pas spécifiques du tissu, cette étape de la synthèse protéique ne peut être impliquée dans l'inhibition.

Une activité ribonucléasique a été exclue à la suite de tests portant sur l'ARN de TYMV, sur les tARN, sur les ARN de levure et les ARN messagers liés aux polysomes.

...

Par ailleurs, l'inhibiteur de réticulocytes modifie considérablement le profil de l'ARN de foie sur gradient de saccharose, alors que l'inhibiteur de foie ne le modifie que très légèrement. Il était donc important de vérifier si cette action était de type nucléasique ou bien s'il s'agissait d'une liaison spécifique de l'inhibiteur à des ARN. Les expériences réalisées sur l'ARN de réticulocytes sont les plus concluantes : cet ARN qui contient en particulier du messager d'hémoglobine est capable de stimuler la synthèse in vitro d'hémoglobine. Cet ARN a été incubé avec l'inhibiteur de foie et repurifié, son activité biologique est restée intacte, ce qui n'aurait pas été le cas s'il avait été détruit par une nucléase présente dans l'inhibiteur. Une combinaison spécifique de l'inhibiteur avec les ARN est donc le mécanisme le plus vraisemblable.

Une méthode permettant de démontrer l'existence du complexe ARN-protéine inhibitrice a été mise au point, à l'aide d'ARN de foie radioactif. L'inhibiteur de réticulocytes se combine préférentiellement à la fraction d'ARN qui contient la plupart des ARN messagers. L'inhibiteur a plus d'affinité pour l'ARN que les autres protéines présentes dans la fraction pH5.

On peut émettre l'hypothèse que les inhibiteurs sont impliqués dans la sélection des ARN qui codent pour les protéines synthétisées dans les différentes cellules.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLFREY, V.G., LITTAU, V.C. et MIRSKY, A.E. (1963)
Proc. Nat. Acad. Sci., 49, 414.

- AMES, B.N. et HARTMAN, P. (1963)
Cold Spring Harbor Symp. Quantit. Biol., 28, 349.

- ANANBA, L.N., KOZLOV, Yu.V., RYSKOV, A.P.R. et GEORGIEV, G.P.
Molecular Biology, 2, n° 5 (1968). (USSR)

- ANFINSEN, C.B., REDFIELD, R.R., CHOATE, W.L., PAGE, J., et CAROL, W.R. (1954)
J. Biol. Chem., 207, 201.

- ARLINGHAUS, R., SHAEFFER, J. et SCHWEET, R. (1964)
Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 1291.

- ATTARDI, G., PARNAS, H., HUANG, M. et ATTARDI, B. (1966)
J. Mol. Biol., 20, 145.

- AWDEH, Z.L., WILLIAMSON, A.R. et ASKONAS, B.A. (1968)
Nature, 219, 66.

- BRITTEN, R.J. et KOHNE, D.E. (1967)
Carnegie Institute Washington Yearbook, 65, 66 Baltimore.

- BRITTEN, R.J. et ROBERTS, R.B. (1960)
Science, 131, 32.

- BROWN, D. et LITTNA, E. (1964)
J. Mol. Biol., n° 58, 669.

- CAMPBELL, P.N., GREENGARD, O. et KERNOT, B.A. (1960)
Biochem. Journal, 74, 107.

- CHAPEVILLE, F., YOT, P., PAULIN, D. (1969)
Cold Spring Harbor Symp. Quantit. Biol., 34, 497.

- CHYTIL, F. et SPELSBERG, T.C. (1971)
Nature New Biol., 233, 215.

- CRADDOCK, V.M. (1970)
Nature, 228, 1264.

- CRICK, F. (1971)
Nature, 234, 53, 23.

...

- DASTUGUE, B., TICHONICKY, L., PENIT-SORIA, J. et KRUH, J. (1970) (a)
Bull. Soc. Chim. Biol., 52, 391.

- DASTUGUE, B., TICHONICKY, L., HANOUNE, J. et KRUH, J. (1970) (b)
FEBS Letters, 8, 133.

- DASTUGUE, B., HANOUNE, J., et KRUH, J. (1971) (a)
FEBS Letters, 19, 65.

- DASTUGUE, B., DEFER, N. et KRUH, J. (1971) (b)
FEBS Letters, 16, 721.

- DREWS, J., BRAWERMAN, G. et MORRIS, H.P. (1968)
Eur. Journ. Biochem., 3, 284.

- GALLWITZ, D. (1971)
FEBS Letters, 13, 306.

- GASKILL, P. et KABAT, D. (1971)
Proc. Nat. Acad. Sci., 68, 72.

- GEORGIEV, G.P. (1967)
Progress, Nucleic Acid Research Mol., 6, 259.

- GILMOUR, P.S. et PAUL, J. (1970)
FEBS Letters, 9, 242.

- GURDON, J.B. (1968)
Scientific Americ., 219, 24 (décembre)

- HAENNI, A.L. et CHAPEVILLE, F. (1966)
Biochem. Biophys. Acta, 114, 135.

- HARRIS, H. (1963)
Progress Nucleic Acid Research, 2, 19.

- HENSHAW, E.C. (1968)
J. Mol. Biol., 36, 401.

- HIATT, H.H. (1962)
J. Mol. Biol., 5, 217.

- HOAGLAND, M.B. (1960)
The Nucleic Acids Vol. III, Acad. Press, N.Y., 349.

...

- HOAGLAND, M.B., SCORNICK, O.A., PFEFFERKORN, L.C. (1964)
Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 1184.

- HUANG, R.C., BONNER, J. (1962)
Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1216.

- KALKHAR, H.M. (1947)
J. Biol. Chem., 167, 461.

- KHOUVINE, Y., OKUDA, J., SZAFAIZ, D. et MAISU'URA, I. (1965)
Bull. Soc. Chim. Biol., 47, 1289.

- KIRBY, K.S. (1956)
Biochemical Journal, 405, 64.

- KLEINSMITH, L.J., ALLFREY, V.G., MIRSKY, A.E. (1966)
Proc. Nat. Acad. Sci., 55, 1182.

- KLEINSMITH, L.J., HEIDEMA, J. et CARROLL, A. (1970)
Nature, 226, 1025.

- KRUH, J., ROSA, J., DREYFUS, J.C. et SCHAPIRA, G.(1961)
Biochem. Biophys. Acta, 49, 509.

- KRUH, J., DREYFUS, J.C., ROSA, J. et SCHAPIRA, G. (1962)
Biochem. Biophys. Acta, 55, 690.

- KRUH, J., SCHAPIRA, G., LAREAU, J.et DREYFUS, J.C. (1964)b)
Biochem. Biophys. Acta, 87, 669.

- KRUH, J., DREYFUS, J.C. et SCHAPIRA,G. (1964)a)
Biochem. Biophys. Acta, 91, 494.

- KRUH, J., DREYFUS, J.C. et SCHAPIRA, G. (1966)
Biochem. Biophys. Acta, 114, 371.

- KRUH, J. et LEVY, F. (1967)
Biochem. Biophys. Acta, 145, 460.

- KRUH, J. et LABIE, D. (1968)
Biochem. Biophys. Acta, 161, 518.

- LABRIE, F. (1969)
Nature, 221, 1217.

...

- LAMFROM, H. et KNOPF, P.M. (1965)
J. Mol. Biol., 11, 589.

- LANE, C.D., MARBAIX, G. et GURDON, J.B. (1971)
J. Mol. Biol., 61, 73.

- LEE, S.Y., MENDECKI, J. et BRAWERMAN G. (1971)
Proc. Nat. Acad. Sc., 68, 1331.

- LEVY, F., TICHONICKY, L. et KRUH, J. (1971)
Biochem. Biophys. Acta, 53, 671.

- LIM, L. et CANELLAKIS, E.S. (1970)
Nature, 227, 710.

- LOEB, J. et CREUZET, C. (1969)
FEBS Letters, 5, 37.

- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et
RANDALL, R.J. (1951)
J. Biol. Chem., 193, 265.

- LUCAS-LENARD, J. et LIPMANN, F. (1967)
Proc. Nat. Acad. Sci., 57, 1050.

- LUKANIDIN, E.H., GEORGIEV, G.P., et WILLIAMSON, R. (1971)
FEBS Letters, 19, 152.

- MALEKNIA, N., ROSA, J. et PADIEU, P. (1966)
Symposium Europ. Technicon, 2, 415.

- MANDEL, J.L. et CHAMBON, P.(1971)
FEBS Letters, 15, 175.

- MOREL, C., KAYIBANDA, B. et SCHERRER, K. (1971)
FEBS Letters, 18, 1.

- MOULE, Y. et CHAUVEAU, J. (1968)
J. Mol. Biol., 33, 465.

- MUSHINSKY, J.F. et POTTER, M. (1969)
Biochemistry, 8, 1684.

- NATHANS, D. et LIPMANN, F. (1961)
Proc. Nat. Acad. Sci., 47, 497.

...

- PALM, P., DERFLER, W., TRAUB, P. et ZILLIG, W. (1964)
Biochem. Biophys., 91, 522.

- RAPER, A.B., GAMMACK, D.B., HUEHNS, E.R. et SHOOTER, E.M. (1960)
British Medicine Journal, 2, 1257.

- RENDI, R. et OCHOA, S. (1962)
J. Biol. Chem., 237, 3711.

- REVEL, M., LELONG, J.C., BRAWERMAN, G. et GROS, F. (1968)
Nature, 219, 1016.

- ROSA, J. (1961)
Bull. Soc. Chim. Biol., 43, 479.

- SAMARINA, O.P., LUKA NIDIN, E.M., MOLNAR, J. et GEORGIEV, G.P. (1968)
J. Mol. Biol., 33, 251.

- SCHAPIRA, G., DREYFUS, J.C., ROSA, J. et KRUH, J. (1961)
in :"Emoglobina" Atti del Simposio internazionale, Perouse, 1961 (Instituto Patologia Generala, Perugia, 1962, 205, 17).

- SCHAPIRA, G., PADIEU, P., MALEKNIA, N., KRUH, J. et DREYFUS, J.C. (1966)
J. Mol. Biol., 20, 427.

- SCHAPIRO, A.L., ELADIO VINUELA, MAIZEL, J.V. (1967)
Biochem. Biophys. Res. Com., 28, 815.

- SCHERRER, K., MARCAUD, L., ZAJDELA, F., LONDON, I. et GROS, F. (1966)
Proc. Nat. Acad. Sci., 56, 1571.

- SCHWEET, R., LAMFROM, H. et ALLEN, E. (1958)
Proc. Nat. Acad. Sci., 44, 1029.

- SIEBERT, G., ORD, M.G. et STOCKEN, L.A. (1971)
Biochem. Journal, 122, 721.

- SMITH, E.W., TORBERT, J.V. (1958)
Bull. Johns Hopkins Hospital, 102, 38.

- SOLL, D. (1971)
Science, 173, 293.

- SPIRIN, A.S. (1966)
Current Tropics in Developmental Biology, vol. I - Acad. Press, N.Y.

- STEIN, H. et HANSEN, P. (1970)
Cold Spring Harbor, vol. 35, 709.

- STENT, G.S. (1964)
Science, 144, 816.

- STEWELEY, W.S. et STOCKEN, L.A. (1968)
Biochem. Journal, 110, 187.

- SUEOKA, N. et KANA SUEOKO, T. (1970)
Progress Nucleic Ac. Res. Mol. Biol., 10, 23.

- VENDRELY, R. et VENDRELY, C. (1966)
Protoplasmatologia, 5, 1.

- WEISBERGER, A.S. et WOLFE, S. (1964)
Fed. Proceedings, 23, 977.

- WEISBERGER, A.S. et WOLFE, S. et ARMENTROUT, S. (1964)
J. Expl. Med., 120, 161.

- WILLIAMSON, R., MORRISON, R., LANYON, G., EASON, R.
et PAUL, J. (1971)
Biochem., 10, 3014.

- WILLIAMSON, R. et DREWIENKIEWICZ, C.E. (1972)
Biochem. J., 128, 92 P.

- WILSON, S.H. et HOAGLAND, M.B. (1965)
Proc. Nat. Acad. Sci., 54, 600.

- WRIGLEY, C. (1968)
Science Tools, 15, 17.

- YANG, S.S. et COMB, D.G. (1968)
J. Mol. Biol., 31, 139.

TABLE des MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

MATERIEL et METHODES :

A - Préparation des systèmes acellulaires 8

I) Système acellulaire de réticulocytes de lapin 8

1. préparation du système 8
2. le milieu d'incubation 8
3. préparation de l'hémoglobine 9

II) Système acellulaire de foie de lapin 10

1. préparation du système 10
2. le milieu d'incubation 10
3. préparation des protéines du foie 12

III) Préparation du système acellulaire de Coli . 12

B - Préparation des inhibiteurs à partir de fractions pH 5 14

I) Préparation de la fraction pH 5 des différents organes de lapin 14

II) Préparation de la fraction pH 5 des réticulocytes 8

III) Fractionnement de pH 5 de foie et de réticulocytes 14

1. Fractionnement sur carboxy méthyl cellulose 14
2. Fractionnement sur diethyl amino éthyl cellulose II Whatman 15

C - Préparation des ARN 16

I) Préparation de l'ARN de noyaux de foie 16

1. préparation des noyaux 16

...

2. extraction de l'ARN 16
3. purification de l'ARN 17

II) Préparation de l'ARN de réticulocytes 18

III) Préparation de l'ARN selon la méthode de Kirby 18

IV) Préparation d'ARN à partir de fractions pH 5 19

D - Techniques analytiques 20

I) Electrophorèses

1. gel de polyacrylamide 20
2. estimation des poids moléculaires par électrophorèse en acrylamide SDS 20
3. détermination du pHi par la méthode d'électrofocalisation 20

II) Détermination de la composition en acides aminés 21

III) Gradients

1. fractionnement de l'ARN en gradient de saccharose 21
2. gradient de polysomes de foie 22

E - Formation de complexes entre ARN de foie et inhibiteur extrait de réticulocytes 23

I) Fractions d'ARN de foie et inhibiteur extrait de réticulocytes 23

II) ARN de foie et différentes protéines issues de la fraction pH 5 de réticulocytes 23

F - Techniques diverses 25

I) Dosage des protéines 25

...

II) Dosage de l'ARN 25

III) Dosage de la Ribonucléase 25

IV) Détermination de l'activité protéolytique .. 26

RESULTATS :

I) Action de la fraction pH 5 de différents organes

1. sur un système acellulaire de réticulocytes 29
2. sur un système acellulaire de foie 35

II) Préparation des inhibiteurs

1. inhibiteur extrait de foie 35
2. inhibiteur extrait de réticulocytes 44

III) Etude analytique des inhibiteurs

1. critère de pureté 53
2. détermination du poids moléculaire 53
3. détermination du pHi 53
4. composition en acides aminés 60

IV) Spécificité des inhibiteurs 60

V) Mécanisme d'action 60

1. activité protéolytique 65
2. action sur les polysomes 65
3. action sur un système de Coli 65
4. action sur la libération et l'assemblage des chaînes d'hémoglobine 65
5. action sur les ARN 71
6. formation d'un complexe ARN-inhibiteur 78

DISCUSSION 83

RESUME 94

BIBLIOGRAPHIE 96

II) Dosage de l'ARN 25
III) Dosage de la Ribonucléase 25
IV) Détermination de l'activité protéolytique .. 26

RESULTATS :

I) Action de la fraction pH 5 de différents organes

1. sur un système accélérateur de réticulocytes 29
2. sur un système accélérateur de foie 35

II) Préparation des inhibiteurs

1. inhibiteur extrait de foie 35
2. inhibiteur extrait de réticulocytes 44

III) Etude analytique des inhibiteurs

1. critère de pureté 53
2. détermination du poids moléculaire 53
3. détermination du pHi 53
4. composition en acides aminés 60

IV) Spécificité des inhibiteurs 60

V) Mécanisme d'action 60
1. activité protéolytique 65
2. action sur les polysomes 65
3. action sur un système de Colt 65
4. action sur la libération et l'assemblage des chaînes d'hémoglobine 65
5. action sur les ARN 71
6. formation d'un complexe ARN-inhibiteur 78

DISCUSSION 83

RESUME 94

BIBLIOGRAPHIE 96